

**OPTIMIZACIÓN DE UN MEDIO DE CULTIVO PARA LA PRODUCCIÓN DE
UN INOCULANTE CON BASE EN *Azospirillum brasilense* C16**

DIEGO MAURICIO RIVERA BOTÍA

**UNIVERSIDAD FRANCISCO DE PAULA SANTANDER
FACULTAD DE CIENCIAS AGRARIAS Y DEL AMBIENTE
PLAN DE ESTUDIOS DE INGENIERÍA DE PRODUCCIÓN
BIOTECNOLÓGICA
SAN JOSÉ DE CUCUTA
2008**

**OPTIMIZACIÓN DE UN MEDIO DE CULTIVO PARA LA PRODUCCIÓN DE
UN INOCULANTE CON BASE EN *Azospirillum brasilense* C16**

DIEGO MAURICIO RIVERA BOTÍA

**Proyecto de grado presentado como requisito para optar al título de Ingeniero de
Producción Biotecnológica**

Directora

**RUTH REBECA BONILLA BUITRAGO
Ph.D. Ciencias Agrícolas
Universidad Agrícola de Varsovia**

Codirector

**ANDRÉS DÍAZ GARCÍA
MSc. Ingeniería Química
énfasis en Ingeniería Bioquímica**

**UNIVERSIDAD FRANCISCO DE PAULA SANTANDER
FACULTAD DE CIENCIAS AGRARIAS Y DEL AMBIENTE
PLAN DE ESTUDIOS DE INGENIERÍA DE PRODUCCIÓN
BIOTECNOLÓGICA
SAN JOSÉ DE CUCUTA
2008**

AGRADECIMIENTOS

A Dios por estar siempre conmigo y ser mi fortaleza para superarme cada día más y así poder luchar para que la vida me depare un futuro mejor.

A los seres que más amo en este mundo: Mi papa y mi mama por el gran esfuerzo que han hecho en este primer paso de mi vida profesional, son ustedes quienes verdaderamente son los dueños de este logro, mil gracias...

A la Dra. Ruth Bonilla por brindarme su apoyo, su confianza y ser la persona que me extendió la mano para proyectarme profesionalmente.

A la Dra. Vera Lucia Baldani por su valiosa colaboración y acompañamiento en el desarrollo del proyecto.

A Diana M. Cárdenas por formarme mediante el semillero de investigación y ser una tutora incansable en la búsqueda de la excelencia.

A Mafe por darme los instrumentos para crecer, por su paciencia e interés por orientarme de la mejor forma posible.

A mis amigas Melissa y Ludy, que les debo gran parte de la realización de este proyecto, que Dios las ilumine y que la vida les depare muchos éxitos.

A mi Lucy por aguantarme y tenerme paciencia todo este tiempo, por su esfuerzo y su cariño hacia mi.

A Corpoica y a todas aquellas personas que trabajan en el laboratorio de Microbiología de Suelos y que de una u otra forma participaron en la realización de esta investigación, hago extensivo mi más sincero agradecimiento.

CONTENIDO

	Pág.
INTRODUCCIÓN	13
1. EL PROBLEMA	14
1.1 TÍTULO	14
1.2 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	14
1.3 FORMULACIÓN DEL PROBLEMA	15
1.4 OBJETIVO	15
1.4.1 Objetivo General	15
1.4.2 Objetivos Específicos	15
1.5 JUSTIFICACIÓN	15
2. MARCO REFERENCIAL	17
2.1 ANTECEDENTES	17
2.2 MARCO TEÓRICO	18
2.2.1 Historia de <i>Azospirillum</i> sp.	18
2.2.2 Biología de <i>Azospirillum</i> sp.	21
2.2.3 Genética de <i>Azospirillum</i> sp.	24
2.2.4 Diseño de un medio de cultivo	25
2.2.5 Diseños factoriales	29
2.3 MARCO CONCEPTUAL	33
2.4 MARCO CONTEXTUAL	33

2.5 MARCO LEGAL	34
3. DISEÑO METODOLÓGICO	39
3.1 TIPO DE INVESTIGACIÓN	39
3.2 POBLACIÓN Y MUESTRA	39
3.2.1 Población	39
3.2.2 Muestra	39
3.3 FASES DE LA METODOLOGÍA	39
3.3.1 Fase I. Conformación banco de cepas y determinación de la cinética de crecimiento de la bacteria <i>Azospirillum brasilense</i> C16.	39
3.3.2 Fase II. Aplicación modelos estadísticos experimentales	44
3.4 INSTRUMENTOS	49
3.5 TÉCNICAS DE ANÁLISIS Y PROCESAMIENTO DE DATOS	49
4. RESULTADOS Y DISCUSIONES	50
4.1 Cinética de crecimiento de <i>A. brasilense</i> C16.	50
4.1.1 Medio de referencia (Medio Dygs)	50
4.2 Diseño de un medio de cultivo	54
4.2.1 Etapa exploratoria (I)	54
4.2.2 Etapa exploratoria (II)	61
4.3 Composición del medio alternativo	68
4.4 Estudio económico de los medios de cultivo Dygs y optimizado	72
5. CONCLUSIONES	74
6. CONSIDERACIONES	75
BIBLIOGRAFÍA	76
ANEXOS	84

LISTA DE TABLAS

	Pág.
Tabla 1. Identificación de diferentes especies del género <i>Azospirillum</i> sp. de acuerdo a los requerimientos nutricionales.	23
Tabla 2. Matriz Plackett-Burman de 11 factores con 12 tratamientos.	31
Tabla 3. Diseño Box-Behnken para tres niveles de concentración de fuentes nutricionales.	33
Tabla 5. Matriz experimental Plackett-Burman para el diseño de un medio de cultivo para <i>A. brasilense</i> C16.	46
Tabla 6. Factores analizados mediante un Diseño Plackett-Burman y codificación de los niveles utilizados para las distintas fuentes nutricionales.	47
Tabla 7. Diseño experimental Box-Behnken para <i>A. brasilense</i> C16.	48
Tabla 8. Número de células (Log UFC/ml) obtenidos aplicando un diseño Plackett-Burman para <i>A. brasilense</i> C16.	54
Tabla 9. Análisis de varianza (<i>Anova</i>) de los resultados obtenidos para determinar los valores de estadístico P, con un nivel de confianza del 95% del diseño experimental Plackett-Burman.	55
Tabla 10. Composición medio alternativo.	60
Tabla 11. Factores influyentes analizados en la etapa de optimización, codificación de los factores para <i>A. brasilense</i> C16.	61
Tabla 12. Número de células (Log UFC/ml) obtenidos del diseño experimental Box-Behnken para <i>A. brasilense</i> C16.	62

Tabla 13. Análisis de varianza (<i>Anova</i>) aplicando el Diseño Box-Behnken para <i>A. brasilense</i> C16. Codificación de los factores: A = aireación (I), B = fuente de nitrógeno (N ₂) y C = fuente de carbono (C ₁).	63
Tabla 14. Costos Medio tradicional Dygs	73
Tabla 15. Costos Medio alternativo optimizado	74

LISTA DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1. Colonización de las raíces en gramíneas por bacterias del género <i>Azospirillum</i> sp.	19
Figura 2. Morfología celular de <i>Azospirillum brasilense</i> .	20
Figura 3. Superficie de respuesta. Diseño Box-Behnken para tres niveles de evaluación.	32
Figura 4. Identificación de <i>A. brasilense</i> C16 en medio Rojo Congo.	40
Figura 5. Morfología celular <i>Azospirillum brasilense</i> observada mediante el microscópio óptico Olympus cx41 con el objetivo 100x.	40
Figura 6. a) Almacenamiento de <i>A. brasilense</i> C16 mantenidos a -20 °C b) Viales de banco de trabajo mantenidos a -20 °C.	41
Figura 7. Espectrofotómetro DU [®] serie 530 Life Science	42
Figura 8. Tratamientos diseño experimental, en un agitador horizontal LAB-LINE [®] Orbit.	44
Figura 9. Cinética de crecimiento para <i>A. brasilense</i> C16 en función del tiempo en el medio de cultivo de referencia.	50
Figura 10. Linealización de la curva de crecimiento para <i>A. brasilense</i> C16 en el medio de cultivo de referencia.	51

Figura 12. Diagrama de Pareto aplicando un Diseño Plackett-Burman para <i>A. brasilense</i> C16. Codificación de los factores: S1 y S2 sales, C1, C2, C3 y C4 fuentes de carbono, N1 y N2 fuentes de nitrógeno, I: aireación, J: agitación, K: microelementos.	56
Figura 13. Diagrama de Pareto aplicando el Diseño Box-Behnken para <i>A. brasilense</i> C16. Codificación de los factores: A: aireación (J), B: fuente de nitrógeno (N2) y C: fuente de carbono (C1).	64
Figura 14. Comportamiento de los factores aplicando el diseño Box-Behnken para <i>A. brasilense</i> C16. Codificación de los factores: A: aireación (J), B: fuente de nitrógeno (N2), C: fuente de carbono (C1).	64
Figura 15. Superficie de respuesta de la interacción entre el factor aireación (A) y la fuente de nitrógeno 2 (B).	65
Figura 16. Superficie de respuesta de la interacción entre la fuente de nitrógeno 2 (B) y la fuente de carbono 1 (C).	66
Figura 17. Superficie de respuesta de la interacción entre el factor aireación (A) y la fuente de carbono1 (C).	66
Figura 18. Cinética de crecimiento para <i>A. brasilense</i> C16 en función del tiempo en el medio de cultivo optimizado.	68
Figura 19. Linealización de la curva de crecimiento para <i>A. brasilense</i> C16 en el medio de cultivo optimizado.	69
Figura 21. Cinética de crecimiento para <i>A. brasilense</i> C16 en función del tiempo en el medio de referencia y en el optimizado.	71
Figura 22. Comportamiento del pH en el medio de cultivo de referencia y en el optimizado.	72

LISTA DE ANEXOS

	Pág.
Anexo A. Medio de cultivo para obtención de biomasa	84
Anexo B. Medios de cultivo para identificación.	84
Anexo C. Medio de cultivo optimizado para la cepa C16	85
Anexo D Caracterización sustratos alternativos	86
Anexo E. Patrón Mac Farland	87
Anexo F. Análisis Estadístico Plackett-Burman	88
Anexo G. Análisis Estadístico Box-Behnken	91

INTRODUCCIÓN

La necesidad de sustituir la agricultura convencional a base de agroquímicos por una agricultura sostenible menos agresiva con el medio ambiente, ha llevado a la investigación y desarrollo de nuevos productos que sean biotecnológicamente viables con un impacto mínimo para el ecosistema y para la salud humana, permitiendo aumentar la calidad nutricional y rendimientos de los cultivos dentro de tecnologías más amigables con la naturaleza.

Una alternativa viable que contribuye favorablemente con este propósito es el uso de los biofertilizantes, los cuales recuperan la fertilidad y productividad del suelo y permiten darle a las plantas los nutrimentos necesarios para su crecimiento contribuyendo en este sentido a mejorar la calidad de los cultivos para su producción agrícola. Desde el punto de vista de una agricultura sostenible, los fertilizantes biológicos constituyen un medio económicamente viable y ecológicamente aceptable al reducir costos a los productores con acceso limitado a fertilizantes de síntesis química.

Por lo tanto, se hace necesario adoptar una estrategia de manejo sustentable a través de mecanismos que favorezcan la implementación de los inoculantes biológicos, buscando opciones económicas las cuales promuevan la reducción de los costos de su producción. Con esto, el mejoramiento del medio de cultivo en donde se desarrolla el microorganismo resulta de gran interés al buscar materias primas innovadoras, de bajo costo que sustituyan a los sustratos actualmente utilizados en el medio de cultivo Dygs, para obtener una igual o mayor concentración de células estable en el tiempo.

De acuerdo a lo anterior, el objetivo de este trabajo de investigación es buscar un medio de cultivo alternativo para la multiplicación de *Azospirillum brasilense* C16, evaluando sustratos de bajo costo que promuevan la producción de biomasa en un menor tiempo de fermentación con relación al medio de cultivo Dygs (Rodríguez Neto *et al.*, 1986), empleando diseños estadísticos experimentales para determinar la influencia de diversos factores a diferentes concentraciones sobre el crecimiento máximo del microorganismo, y en un futuro producir un inoculante con base en bacterias del género *Azospirillum* sp., a escala industrial con menor costo.

1. PROBLEMA

1.1 TÍTULO

OPTIMIZACIÓN DE UN MEDIO DE CULTIVO PARA LA PRODUCCIÓN DE UN INOCULANTE CON BASE EN *Azospirillum brasilense* C16.

1.2 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La necesidad de aumentar la productividad agrícola mediante el manejo intensivo de fertilizantes de síntesis química, con el objetivo primario de elevar los rendimientos de las cosechas, ha generado cambios radicales en las condiciones de vida de la microflora del suelo, es decir, una destrucción de las asociaciones microbianas normales y cambios en su actividad funcional y bioquímica. Dando como consecuencia la eutroficación, degradación paulatina de la fertilidad de los suelos y contaminación del medio ambiente incluyendo la obtención de productos con menor calidad para el consumo humano y animal (Celis & W. Koskinen, 2001).

Estudios de costos de producción señalan la reducción en la utilización de agroquímicos por los agricultores en los últimos ocho años, debido a los altos costos que generan estos insumos para lograr el máximo rendimiento de los cultivos. Es por esto, que una de las alternativas que puede contribuir con la disminución de fertilizantes de síntesis química es la generación de técnicas de producción agrícola enfocadas al uso eficiente de los recursos que tiendan a una agricultura sostenible y de bajo impacto agrícola. En este sentido, el interés de adoptar tecnologías limpias mediante el manejo de microorganismos con potencial biofertilizante, se ha convertido en la mejor alternativa para reducir estos impactos y así mismo contribuir con el mejoramiento de las condiciones medioambientales, económicas y sociales (Laria *et al.*, 2003).

Para lograr este objetivo, una de las herramientas que puede favorecer la implementación de inoculantes biológicos, es el uso de mecanismos que permitan la producción de estos insumos a bajo costo; por lo que el medio de cultivo en el que se promueve el crecimiento del microorganismo juega un papel importante en la reducción de costos de producción de un biofertilizante. El medio de cultivo Dygs, que se utiliza para la multiplicación de bacterias pertenecientes al género *Azospirillum* sp. presenta inconvenientes a la hora de utilizarlo para un proceso de producción a escala piloto, debido a que genera altos costos por los sustratos grado reactivo que se emplean, baja

tasa de producción de biomasa del microorganismo y dificultades de contaminación en el manejo de este por ser un medio muy enriquecido que favorece el crecimiento de un amplio rango de microorganismos con diferentes metabolismos (Comunicación personal Dra. Vera Lucia Baldani-Embrapa).

1.3 FORMULACIÓN DEL PROBLEMA

¿La implementación de fuentes nutricionales alternativas de menor costo permitirán una producción óptima de biomasa de *Azospirillum brasilense* C16?

1.4 OBJETIVOS

1.4.1 Objetivo General. Optimizar un medio de cultivo para la producción de un inoculante con base en bacterias en *Azospirillum brasilense* C16.

1.4.2 Objetivos específicos

Evaluar las fuentes de crecimiento que favorecen la producción de biomasa por medio del diseño experimental Plackett-Burman.

Optimizar los resultados obtenidos del diseño experimental Plackett-Burman, mediante el diseño de Box-Behnken.

Evaluar el medio de cultivo alternativo sobre la cinética de crecimiento del microorganismo vs el medio de cultivo de referencia.

Evaluar la relación costo-beneficio con base en un estudio económico del medio de cultivo optimizado con relación al medio de referencia.

1.5 JUSTIFICACIÓN

El uso de la fertilización de síntesis química se ha incrementado en los últimos años para asegurar la productividad y rendimientos de los cultivos, lo que ha provocado un deterioro ecológico progresivo por el manejo inadecuado de los mismos, generando

preocupación por la contaminación del ecosistema. Comprender esta situación, nos lleva a buscar y desarrollar tecnologías limpias y menos costosas que permitan mejorar la calidad de los cultivos supliendo los nutrimentos necesarios para su producción.

Por tal razón, se ha recurrido a la biotecnología que es una herramienta que permite manipular microorganismos con potencial biofertilizante, debido a que una de sus principales funciones es suministrar nutrientes como el nitrógeno, que se hace disponible a las plantas mediante la acción de bacterias que habitan en el suelo naturalmente con la capacidad de fijar el elemento presente en la atmósfera y fijarlo en las raíces de las plantas. Es así, como las bacterias pertenecientes al género *Azospirillum* sp., al ser inoculadas en el suelo, incrementan la densidad y longitud de los pelos radicales, proporcionando de esta forma mayor captación de agua y nutrientes del suelo, lo cual le permite a la planta acumular más materia seca, N, P y K en tallos y hojas mostrando resultados favorables en el desarrollo de las plantas.

Cárdenas (2007), confirmó estos hallazgos al aislar a partir de suelos y pastos del Valle del Cesar este tipo de microorganismo. Evaluó la inoculación de esta bacteria en semillas de pasto *Panicum maximum* Jacq c.v. Tanzania en inoculación simple (*Azospirillum* sp.) y en coinoculación con una cepa fosfatosolubilizadora de *Enterobacter agglomerans* (UV1), aislada de suelos algodóneros del Cesar. Esta inoculación aumentó hasta 20 % en proteína cruda y 45% en materia seca comparada con las plantas fertilizadas con fuentes nutricionales químicas bajo condiciones de invernadero.

Con base en estos señalamientos, se pretende optimizar un medio de cultivo para el crecimiento de *Azospirillum brasilense* C16, empleando fuentes nutricionales menos costosas, debido a que el medio de cultivo tradicional que se usa para el crecimiento de este microorganismo presenta altos costos al utilizar sustratos grado reactivo para producir a escala industrial un fertilizante biológico a partir de esta bacteria.

Es por esto, que en la medida que se optimicen los procesos para mejorar el medio de cultivo donde se desarrolla esta bacteria empleando materias primas de bajo costo, constituirá una alternativa con mejor proyección al generar inoculantes biológicos con la misma calidad y estabilidad que los fertilizantes nitrogenados en el mercado, contribuyendo de esta forma al desarrollo de tecnologías integrales para la conservación del suelo y la nutrición de los cultivos de pasto y pueda ser rentable esta actividad que es uno de los renglones económicos más importantes del país.

2. MARCO REFERENCIAL

2.1 Antecedentes

En la región del Caribe Seco Colombiano se cultivan los pastos que son la base alimenticia del ganado, siendo el Cesar uno de los principales departamentos ganaderos de Colombia dedicado a la producción conjunta de leche y de carne. El pasto guinea (*Panicum maximum* jacq), es uno de los cultivos que alcanza una de las mayores productividades en materia seca por hectárea, obteniéndose alrededor de 12 a 18 ton/ha. Motivo por el cual Cárdenas, (2007) inició el estudio de cepas nativas de *Azospirillum* sp. en el pasto Guinea del Valle del Cesar, como primer paso hacia la búsqueda de aislamientos promisorios con potencial biofertilizante que sea utilizable en estos cultivos, posibilitando la reducción de hasta un 70% en la aplicación de fertilizantes nitrogenados y favoreciendo la conservación de los suelos. Esto debe redundar en el incremento de la productividad y calidad nutricional de esta gramínea utilizada en la alimentación de la ganadería de esta región. Los resultados obtenidos en esta investigación, mostraron un incremento significativo en la producción de materia seca y proteína cruda en las plantas de Guinea (*Panicum maximum* c.v. Tanzania) en condiciones de invernadero, cuando fueron inoculadas con cepas de *Azospirillum* sp. y coinoculadas con una cepa fosfatosolubilizadora (UV1), con respecto a las plantas no inoculadas (testigo químico y testigo absoluto).

Con base en lo anterior, la Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria-Corpoica-CBB avanza en el desarrollo de un biofertilizante basado en microorganismos nativos eficientes en la fijación biológica de nitrógeno como las bacterias del género *Azospirillum* sp., teniendo en cuenta su amplia diversidad asociada a gramíneas forrajeras en regiones tropicales. Los resultados demuestran un mejoramiento de la producción de forraje en términos de cantidad y calidad, creando condiciones más favorables de competitividad y sostenibilidad de los sistemas ganaderos.

Bashan & Levanony (1990), Summer (1990), Fages (1994), Okon y Labandera-González (1994), citados por Dobbelaere *et al.* (2001), concluyen que la inoculación con *Azospirillum* sp. incrementó significativamente de un 5-30 % en el rendimiento de materia seca foliar, granos y proteína foliar, así como en el desarrollo radical, en alrededor de 60 -70 % de los experimentos en campo. Resultados de varios trabajos durante seis años en cuatro países corroboraron las extensas observaciones de las décadas de 1980 y 1990, acerca de los efectos positivos de los inoculantes con base en *Azospirillum* sp., que condujeron a incrementos de los rendimientos de los cultivos en la mayoría de los experimentos llevados a cabo en diferentes suelos, con relativamente bajo contenido de materia orgánica (Dobbelaere *et al.*, 2001).

Bajo este enfoque, se inició un estudio en Corpoica, C.I Tibaitatá sobre la optimización de medios de cultivos alternativos para la producción de bacterias de interés agrícola, empleando diseños experimentales basados en modelos estadísticos que permiten llevar a cabo un gran número de variables simultáneamente y estimar la interacción entre estas. El uso de estos métodos permite generar un modelo con alta calidad de predicción maximizando la variable de respuesta evaluada (Montgomery, 1991).

En varias investigaciones se han reemplazado los reactivos químicos empleados en diferentes medios de cultivo por fuentes nutricionales de bajo costo permitiendo obtener el mismo rendimiento o superar la concentración del microorganismo.

En el 2005, Díaz & Cotes, evaluaron el mejoramiento de un medio de cultivo para la levadura *Pichia onychis* investigando tres fuentes de carbono y ocho fuentes de nitrógeno como sustratos alternativos y dos variables fisicoquímicas utilizando un diseño factorial fraccionado como punto de partida para llevar a cabo después un proceso de optimización aplicando un diseño estadístico central compuesto rotacional. Los resultados obtenidos demostraron un máximo rendimiento de $8,95 \times 10^9$ cél/ml equivalentes a una biomasa seca de 6,30 g/L utilizando materias primas de bajo costo y en menor cantidad que el medio de cultivo de referencia mejorando así la economía del proceso en el laboratorio de Control biológico del Centro de Biotecnología y Bioindustria (CBB)-Corpoica, C.I Tibaitatá.

En el 2007, en los trabajos realizados en el laboratorio de Microbiología de Suelos del Centro de Biotecnología y Bioindustria (CBB)-Corpoica, C.I Tibaitatá por Torres & Yepes, junto con Plazas C., evaluaron sustratos alternativos para la bacteria fijadora de nitrógeno *Azotobacter chroococcum* y para la bacteria fosfato solubilizadora *Enterobacter agglomerans*, respectivamente. En estos estudios se analizaron fuentes de carbono, fuentes de nitrógeno, soluciones nutritivas, sales y factores físicoquímicos planteando diseños experimentales mediante una etapa preliminar exploratoria de los factores y sustratos más influyentes, seguido de un diseño factorial completo y una etapa de optimización. Los resultados obtenidos manifestaron menores tiempos de fermentación, un aumento de dos unidades logarítmicas en la concentración de biomasa de los microorganismos estudiados y una disminución de los costos del proceso con respecto al medio tradicional.

2.2 MARCO TEÓRICO

2.2.1 Historia de *Azospirillum* sp.: *Spirillum lipoferum*, ahora llamado *Azospirillum*, fue descrito por primera vez en 1925 por Martinus Willem Beijerinck, luego de lo cual la bacteria permaneció en el olvido por varias décadas. Las observaciones de Juan José Peña-Cabriales y Johanna Döbereiner en 1973, inician la época moderna de este microorganismo.

Hiltner en 1904, observó por primera vez la acumulación de microorganismos en la zona radical y propuso el término rizósfera. Los exudados radiculares, conformados por sustancias diversas crean alrededor de las raíces, un ambiente nutricional enriquecido que favorece el crecimiento bacteriano. Smith (1976) & Martín & Kemp (1980) reportan la presencia de carbohidratos y aminoácidos, y señalan que la composición y cantidad de exudados varía con la especie presente y las condiciones abióticas, tales como agua y temperatura (Figura 1).

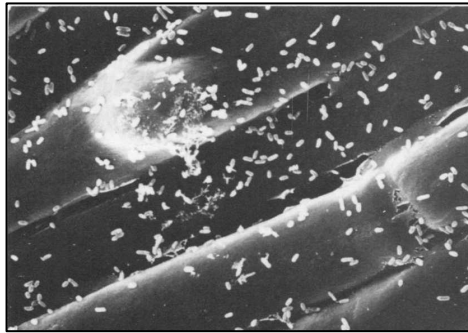


Figura 1. Colonización de las raíces en gramíneas por bacterias del género *Azospirillum* sp. (Mercedes García, *et al.*, 1980).

El género *Azospirillum* fue el primero estudiado por J. Döbereiner por su capacidad de fijación de nitrógeno y ocurrencia en la rizósfera, formando diferentes clases de asociaciones con plantas no leguminosas. Las especies de *Azospirillum* son rizobacterias fijadoras de nitrógeno con potencial para incrementar los rendimientos de cereales y gramíneas de importancia económica en diferentes regiones climáticas. Los efectos benéficos sobre el crecimiento de las plantas no están dados solamente por la fijación de nitrógeno en la rizósfera, si no también está relacionado por la capacidad para reducir nitrato, solubilizar fosfatos, sintetizar antibióticos y sustancias promotoras del crecimiento de las plantas, incluyendo fitohormonas y sideróforos. Los efectos positivos de la inoculación bacteriana están principalmente asociados al mejoramiento del desarrollo de las raíces y consecuentemente incrementar la tasa de absorción de agua y minerales (Dalla *et al.*, 2004).

Clasificación taxonómica

Estudios taxonómicos de *S. lipoferum* condujeron a su reclasificación en un género nuevo, *Azospirillum* son reconocidas seis especies en el género *Azospirillum*. Las dos primeras en ser descritas fueron *A. lipoferum* y *A. brasilense* (Tarrand *et al.*, 1978), siendo éstas las más estudiadas. Consecutivamente fueron descritas las especies *A. amazonense* (Magalhães *et al.*, 1983), *A. halopraeferans* (Reinhold *et al.*, 1987), *A. irakense* y *A. largomobile* (Khammans *et al.*, 1989), siendo el nombre de esta especie corregido a *A. largimobile*. Pocos años antes ésta especie fue considerada como un

sinónimo de la especie *A. lipoferum*. Recientemente, en honor de quien impulsara los estudios con este género bacteriano y descubriera otros diazótrofos, se ha propuesto la especie candidata *A. doebereineriae* (Eckert *et al.*, 2001). Posteriormente se han descrito 5 nuevas especies: *A. oryzae*, (Xie *et al.*, 2005), *A. melinis* (Peng *et al.*, 2006), *A. zaeae*, *A. canadense* (Mehnaz *et al.*, 2007) y *A. rugosum* (Young, 2008).

Pocos años después del redescubrimiento de *Azospirillum* sp. y hasta alrededor de 1993, este género fue el más estudiado entre las bacterias asociadas a plantas. La capacidad de *Azospirillum* sp., para estimular el crecimiento de las plantas y de aumentar el rendimiento de los cereales promovió numerosos estudios sobre la ecología, fisiología y genética de esta bacteria (Caballero, 2000).

Generalidades Género *Azospirillum* sp.



Figura 2. Morfología celular de *Azospirillum brasilense*.
(web.umr.edu/~microbio/BIO221_1999/Flag.jpg)

El género *Azospirillum* sp., pertenece a la subclase alfa de las proteobacterias (Young, 1992) de la familia Rhodospirillaceae, siendo *A. lipoferum* la especie tipo. Características útiles en la identificación rutinaria son la forma vibroide, el pleomorfismo y su movilidad en espiral (Figura 2). Las células contienen cantidades elevadas de poli-β-hidroxibutirato (PHB), hasta 50% del peso seco celular (Okon & Burris, 1976), observándose al microscopio las células jóvenes con abundantes gránulos refringentes.

Las bacterias del género *Azospirillum* sp., tienen la capacidad de producir auxinas, citoquininas y giberelinas en medios de cultivo. No obstante, el mecanismo analizado con mayor amplitud ha sido la producción de auxinas, que puede modificar el contenido de fitohormonas de las plantas conduciendo a la estimulación del crecimiento de las mismas, como el caso del Ácido Indol Acético (**AIA**), el cual induce al aumento de pelos radicales, logrando una mayor captación de nutrientes.

En cultivos semisólidos y sólidos con más de 24 horas de incubación se presentan frecuentemente células refringentes con forma ovoide y de paredes gruesas similares a quistes. Una de las características fenotípicas más ampliamente usada como criterio para el reconocimiento tentativo del género *Azospirillum* sp., es el color rojo escarlata que toman las colonias al crecer en un medio adicionado del colorante rojo Congo (Rodríguez Cáceres, 1982). No obstante, en este medio pueden hallarse colonias mutantes de *Azospirillum* sp., de color blanco debido a la incapacidad de producir polisacáridos no identificados (Bastarrachea & Rivas, 1987).

Características fisiológicas del género *Azospirillum* sp.

Las bacterias del género *Azospirillum* sp., son eubacterias gram-negativas, de forma bacilar con un diámetro de (1,0 µm x 2,1-3,8 µm), su movilidad se debe a la presencia de material fibrilar creciendo en concentraciones bajas de oxígeno.

Este tipo de bacterias son fijadores de nitrógeno y hacen parte del grupo de diazótrofos asociativos que contribuyen al crecimiento de la planta sin la formación de estructuras diferenciadas y no establecen simbiosis creciendo exitosamente a pH de 6,8-7.0 (Marín *et al.*, 1999).

Son bacterias químio-organotróficas y pueden utilizar como fuente de carbono azúcares, alcoholes, sales de ácidos orgánicos y como fuente de nitrógeno pueden disponer de nitrato, sales de amonio y ciertos aminoácidos (Holt, 1984).

2.2.2 Biología de *Azospirillum* sp.

Forma de reproducción: División celular

Mecanismos de supervivencia: *Azospirillum* sp., produce y acumula gránulos de poli-β-hidroxibutirato (PHB), los cuales son empleados por la propia célula como fuentes de carbono y energía durante períodos de inanición e incluso son capaces de formar quistes en condiciones muy desfavorables (Laria, 2003).

Competencia: El crecimiento de este microorganismo en la rizósfera viene determinado fundamentalmente por la disponibilidad de sustratos que estén presentes en el medio rizosférico y que sean necesarios para su desarrollo. También diversas sustancias de origen vegetal y microbiano que estén presentes en la rizósfera pueden afectar el desarrollo de estas bacterias mediante efectos estimuladores e inhibidores. Se considera que los aminoácidos derivados de las plantas pueden estimular o reprimir la actividad de la enzima nitrogenasa en ciertas cepas de *Azospirillum* sp.

De igual forma, las condiciones ambientales (clima, tipo de suelo, temperatura y humedad del mismo) influyen en los procesos interactivos que determinan la estructura de la comunidad microbiana, así como también en la asociación *Azospirillum* sp.-planta, la fijación del nitrógeno y su contribución a la nutrición vegetal (Laria, 2003).

Aerotaxia: Las condiciones de baja concentración de oxígeno son las adecuadas para el crecimiento y multiplicación de las células bacterianas, siendo repelidas por las altas concentraciones de oxígeno y condiciones anaeróbicas. La aerotaxia parece ser especialmente importante bajo condiciones de fijación de nitrógeno, permitiéndole a las células de *Azospirillum* sp., alcanzar concentraciones de oxígeno lo suficientemente bajas para que se exprese la actividad nitrogenasa; debido a que esta enzima puede inhibirse por las altas concentraciones de este gas (Barak *et al.*, 1982).

Producción de polihidroxibutirato: Los polihidroxicanoatos (PHA), son una familia de poliésteres de ácidos alcanóicos, insolubles en agua, biodegradables y no tóxicos, que contienen un grupo hidroxilo como grupo funcional en adición al grupo carboxilo. La variabilidad de la posición del grupo hidroxilo y del grupo funcional, así como la variedad de monómeros y de grado de polimerización, permiten la biosíntesis de muchos polímeros diferentes con propiedades físicas diversas (Steinbuchel *et al.*, 1995 & Lee, 1996). Para ellos se ha encontrado amplia aplicación en todas las esferas tecnológicas y biomédicas (Nakamura *et al.*, 1992). Todas las bacterias: aerobias, anaerobias, heterótrofas y fotosintéticas son capaces de acumular PHA hasta 90% de su peso seco (Kawaguchi & Doi, 1992). Las bacterias diazotróficas, en particular, acumulan éstos polímeros como estrategia de supervivencia y de regulación del metabolismo energético, tanto en simbiosis como en vida libre.

La bacteria del género *Azospirillum* sp., produce el elemento más pequeño de esta familia, el polihidroxibutirato (alrededor de 1,5 g/L). Dicha producción está influenciada negativamente por altos niveles de aireación, bajos niveles de nitrógeno y fósforo (Martínez, J. *et al.*, 2004).

La agregación y la formación de quistes mejora la sobrevivencia de *Azospirillum* sp., situación en la que la acumulación de poli- β -hidroxibutirato (PHB), parece desempeñar una función importante al servir como almacén de carbono y energía (Okon *et al.*, 1976). Además, diversas funciones fisiológicas son atribuidas al PHB, destacándose la mayor resistencia a la desecación (Sadasivan & Neyra, 1987), a la luz ultravioleta y al choque osmótico (Tal & Okon, 1985). Se ha sugerido que la formación de quistes podría desempeñar una función importante en la sobrevivencia de *Azospirillum* sp. en el ambiente rizosférico, cuando los nutrientes son limitados, previo a la asociación con las raíces de la planta (Okon & Itzigsohn, 1992).

Floculación: Bajo diferentes condiciones de estrés, las bacterias son capaces de producir quistes y flóculos (células vegetativas rodeadas por una red de polisacáridos),

los cuales incrementan su supervivencia. Estos fenómenos pueden ser el resultado de la edad (Sadasivan & Neyra, 1987), condiciones del cultivo (Bleakley *et al.*, 1988) o estrés por falta de agua (Bashan *et al.*, 1991). Se ha encontrado que al crecer *Azospirillum* sp., bajo ciertas condiciones de cultivo como la presencia de fructosa y nitratos, se promueve la síntesis de polisacáridos extracelulares y se induce la formación de agregados celulares.

Metabolismo de *Azospirillum* sp.: Las especies de *Azospirillum* sp., difieren en su capacidad para utilizar diferentes compuestos como fuentes de carbono y nitrógeno (Tabla 1). Estas bacterias usan para su crecimiento unos pocos monosacáridos y disacáridos así como alcoholes polihidroxilados, y principalmente diversos ácidos orgánicos tales como málico y succínico y algunos aminoácidos (Hartmann & Burris, 1988). Para el uso de diferentes fuentes de carbono, tanto *A. lipoferum* como *A. brasilense* tienen todas las enzimas de la vía de Embden-Meyerhof-Parnas y de la vía de Entner-Doudoroff (Westby *et al.*, 1983), así como todas las enzimas del ciclo de los ácidos tricarbóxicos (Martínez *et al.*, 1984). Tanto *A. lipoferum* como *A. brasilense* tienen la capacidad de crecer autotróficamente con H₂ y CO₂, proceso en el que participa la ribulosa-1,5- difosfato carboxilasa (Tilak *et al.*, 1986).

Tiene un metabolismo carbonado y nitrogenado muy versátil, lo que le permite adaptarse y establecerse en el competitivo entorno rizosférico. Como fuentes nitrógenadas, *Azospirillum* sp., puede utilizar un amplio rango de sustratos como: amonio, nitrato, nitrito, aminoácidos y nitrógeno molecular. En condiciones desfavorables, tales como desecación y carencia de nutrientes, puede enquistar, recubriéndose de una capa de polisacáridos produciendo una acumulación de gránulos de β-hidroxibutirato, que sirven a la bacteria de reserva de fuente carbonada (Bashan & Vazquez, 2000).

Tabla 1. Identificación de diferentes especies del género *Azospirillum* sp., de acuerdo a los requerimientos nutricionales. (Eckert, *et al.*, 2001).

Phenotypic feature	<i>A. doberleiniae</i> sp. nov.	<i>A. lipoferum</i>	<i>A. larginibile</i>	<i>A. brasilense</i>	<i>A. halopraeferen</i>	<i>A. irakense</i>	<i>A. amazonense</i>
Carbon utilization with API50							
CHE and API20 NE (aerobic):							
<i>N</i> -Acetylglucosamine	-	+	+	-	ND	+	d
D-Glucose	d	+	+	d	-	+	+
Glycerol	+	+	+	+	+	-	-
D-Mannitol	+	+	+	-	+	-	-
D-Ribose	-	+	+	-	+	d	+
D-Sorbitol	+	+	+	-	-	-	-
Sucrose	-	-	ND	-	-	+	+
Acid from (API50, anaerobic):							
D-Glucose	d	+	+	-	-	-	-
D-Fructose	+	+	+	-	+	-	-
Biotin requirement	-	+	-	-	+	-	-
Optimal temperature for growth (°C)	30	37	28	37	41	33	35
Polymorphic cells	+	+	+	-	+	+	+

La riqueza en compuestos orgánicos en la espermósfera/rizósfera conduce a intensas actividades e interacciones microbianas. Algunos estudios indican que la quimiotaxis a los exudados de raíz es uno de los factores que influyen en la llegada de los microorganismos a la rizósfera (Schmidt, 1979). Tanto en *A. lipoferum* como en *A. brasilense* se demostró una fuerte actividad quimiotáctica hacia diversos azúcares, ácidos orgánicos y aminoácidos (Barak *et al.*, 1983), así como a compuestos aromáticos (López & Lovell, 1993) y exudados radicales (Alvarez & Pastrana, 1980). La respuesta quimiotáctica a diferentes fuentes de carbono es variable dependiendo de la especie de *Azospirillum* sp., e incluso es específica (Reinhold & Fendrik, 1985).

2.2.3 Genética de *Azospirillum* sp.

El complejo enzimático N-asa está constituido por dos metaloproteínas y contiene tres tipos de grupos prostéticos. La proteína I es llamada también dinitrogenasa o “Hierro-molibdeno-proteína” por que contiene el cofactor con hierro y molibdeno (FeMo-Co). El otro componente, la proteína II, es igualmente denominada dinitrogenasa reductasa o “Hierro-proteína”, la cual tiene la función de transportar los electrones del donador fisiológico de electrones, ferredoxina o flavodoxina, hacia la proteína I para llevar a cabo la reducción de la molécula de N₂ (Baca *et al.*, 2000). El sustrato fisiológico para la nitrogenasa es el N₂. Sin embargo, la nitrogenasa es versátil y puede reducir una variedad de sustratos. La reducción de protón a H₂ es una reacción obligatoria de la nitrogenasa cuando reduce N₂, N₂O, cianuro, metil isocianuro, azida, acetileno, ciclopropano, cianamida y diazirina que también sirven como sustratos. El N₂O fue uno de los primeros compuestos en que se ha demostrado el uso de sustratos alternativos para la nitrogenasa (Burris, 1991).

La biosíntesis de la dinitrogenasa involucra de 15 a 20 genes, de los cuales los genes involucrados en la fijación de nitrógeno (genes *Nif*, identificados en *Azospirillum brasilense*), están localizados en por lo menos cuatro regiones del genoma (Singh *et al.*, 1989). La nitrogenasa está estrictamente regulada por la concentración intracelular de amonio u otras formas de nitrógeno (Oelze & Klein, 1996) y además, se inactiva irreversiblemente a concentraciones altas de oxígeno, por lo que los microorganismos diazotróficos de respiración aerobia enfrentan el problema de mantener una nitrogenasa activa en presencia de oxígeno.

Un sistema regulador de la actividad nitrogenasa en *Azospirillum* sp. es la enzima glutamina sintetasa (*glnA*), junto con la glutamato sintasa (*gltBD*), forma parte de la ruta principal de asimilación del nitrógeno por bacterias diazotróficas y es a través de esta ruta que las células se surten de glutamato y glutamina, intermediarios clave en el metabolismo del nitrógeno.

2.2.4 Diseño de un medio de cultivo

El diseño de un medio de cultivo tiene como finalidad la selección de los componentes necesarios para lograr el crecimiento y la formación de productos de acuerdo al tipo de microorganismo, su metabolismo y requerimientos nutricionales específicos.

Medio de Cultivo: Se llama cultivo al proceso de propagar microorganismos brindándoles las condiciones ambientales adecuadas. Los microorganismos en crecimiento están haciendo réplicas de sí mismos, y requieren de los elementos que se encuentran en su composición química. Los nutrientes deben brindarles estos elementos de manera accesible desde el punto de vista metabólico. Además, estos microorganismos requieren energía metabólica para sintetizar macromoléculas y conservar los gradientes químicos esenciales a través de sus membranas. Los factores que se deben regular durante el crecimiento son nutrientes, pH, temperatura, aireación, concentración de sales y fuentes de C/N (Torres & Yepes, 2007).

Requerimientos nutricionales de *Azospirillum* sp.

Los requerimientos nutricionales están determinados por el tipo de metabolismo celular. Otro factor esencial está determinado por las condiciones del cultivo.

Para la producción de biomasa en bacterias del género *Azospirillum* sp., es importante mantener en el sustrato la relación C/N mínima para iniciar el metabolismo microbiano (Novo, 1993). La preparación de medios para el desarrollo de procesos, tanto de fermentación como desarrollo de los microorganismos, es una etapa fundamental para asegurar la productividad de los mismos, que podrán ser utilizados y escalados a nivel industrial (Brock *et al.*, 1987)

Fuente de Carbono: La glucosa es utilizada por *A. lipoferum*. Sin embargo, *A. brasilense*, no puede utilizar la glucosa como única fuente de carbono en crecimiento dependiente de N₂ (Krieg & Döbereiner, 1984). Además el carbono es necesario para que se lleve a cabo el proceso de fijación de nitrógeno (Liengen, 1999).

Cuando al microorganismo se le agota la fuente de carbono exógena y se encuentra bajo estrés nutricional esta bacteria forma agregados celulares conocidos con el nombre de quistes que le permiten sobrevivir y tomar carbono almacenado de forma endógena; este proceso es regulado por su ciclo metabólico (Okon *et al.*, 1976).

Entre las especies del género *Azospirillum* sp., más estudiadas se encuentran *Azospirillum brasilense* y *Azospirillum lipoferum* que crecen bien en ácidos orgánicos como el málico, succinato, láctico y pirúvico. Sin embargo, el crecimiento empleando los hidratos de carbono es más restringido, y *A. brasilense* es particularmente exigente en sus necesidades de carbono. No crecen en D-glucosa, D-manosa, D-sorbose y

sacarosa; pero no crece (y fija N₂) en D-fructosa, galactosa, D- y L-arabinosa. *A. lipoferum* es menos restringido en su uso de fuentes de carbono, debido a que crece en los mismos ácidos orgánicos y carbohidratos utilizados por *A. brasilense* y además crece en glucosa, manosa y sorbosa. Las mismas diferencias metabólicas entre las especies se encuentran en N₂ (Döbereiner, 1983 datos no publicados). A pesar de que *Azospirillum* sp. ha sido ampliamente estudiado, sus rutas metabólicas no se han examinado extensamente (Döbereiner, 1983).

Fuente de Nitrógeno: Cuando existe bajas cantidades de nitrógeno se expresa la actividad nitrogenasa. La presencia de cofactores como Hierro-Molibdato (FeMo) contribuye en la fijación de nitrógeno (Steenhoudt & Vanderleyden, 2000). El nitrógeno es utilizado para la biosíntesis de proteínas, ácidos nucleicos y polímeros de la pared celular. Para la síntesis de proteínas se requieren en general L-aminoácidos, aunque también son necesarios algunos aminoácidos de la serie D como D-alanina y D-aspártico para su incorporación a la pared de las células. En algunos casos se requieren también péptidos de histidina por *Azospirillum lipoferum* para la fijación de nitrógeno (Hartmann & Burris, 1988).

Fuente de Fósforo: El fósforo es considerado como un elemento esencial para el desarrollo de *Azospirillum* sp. en suelos y medios de cultivo, puesto que estimula el metabolismo del carbono y la fijación de nitrógeno. Su escasez o ausencia puede inhibir el desarrollo del microorganismo (Steenhoudt & Vanderleyden, 2000).

Los requerimientos de otros macronutrientes como el P y S son suministrados en forma de PO₄H y SO₄ (o aminoácidos azufrados). 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 (Estola *et al.*, 1994).

Fuente de Magnesio y potasio: Se conoce que estos elementos son necesarios para que *Azospirillum* sp. lleve a cabo la fijación de nitrógeno. Una parte importante del K, está unido 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 enzima 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 metabólicas. Tanto el K como el Mg se incorporan a los medios en forma de sales como fosfato y sulfato (Estola *et al.*, 1994).

Las cantidades necesarias de potasio (K) son menores y cuando existen altas concentraciones de éste en el suelo, se inhibe el desarrollo de las bacterias fijadoras, dependiendo del grado de toxicidad de la fracción aniónica de sal (Roldán *et al.*, 2003).

Microelementos: Los requerimientos de elementos menores son notables para estas bacterias al contribuir al funcionamiento estructural de varias enzimas, se recomienda la adición de de 1 ml/L en medios de cultivo para el desarrollo de *Azospirillum* sp. (Comunicación personal, Dra. Vera Baldani-Embrapa).

Se distinguen dos categorías de micronutrientes: a). los que son frecuentemente utilizados para el crecimiento como: Ca, Mn, Fe, Co, Cu y Zn y b). los que son raramente esenciales como: B, Na, Al, Si, Cl, V, Cr, Ni, Se, As, Mo, Sn, I. A veces es difícil demostrar un requerimiento de un micronutriente porque generalmente está presente en suficiente cantidad como impureza de los componentes principales. Los requerimientos de estos componentes pueden aumentar varias veces cuando el cultivo ha estado sujeto a stress como el aumento de temperaturas por encima de un valor óptimo (Estola *et al.*, 1994).

Vitaminas: Muchos de estos factores de crecimiento funcionan formando parte de coenzimas. La mayor parte de los microorganismos son capaces de sintetizar todos los componentes de sus coenzimas, pero algunos no lo son y necesitan que se les suministre ciertas partes de estas coenzimas en forma de vitaminas. Las principales vitaminas requeridas por los microorganismos son tiamina (vitamina B₁), biotina, riboflavina, ácido nicotínico, ácido pantoténico y piridoxina (vitamina B₆ y B₁₂) (Madigan *et al.* 2002). *Azospirillum* sp., produce este tipo de vitaminas del grupo B, al crecer en el cultivo y su crecimiento se ve afectado por la presencia de éstas sustancias y/o al aplicarlas artificialmente al medio (Dahm *et al.*, 1993 & Rodelas *et al.*, 1993).

Efectos de factores físicoquímicos sobre *Azospirillum* sp.

Cuando las bacterias se siembran en un medio de cultivo óptimo y bajo condiciones adecuadas de incubación, ocurre un incremento en el número de células en períodos muy cortos. En algunas especies se alcanza la población máxima en 24 horas, en cambio, en otras se necesita un período más prolongado para alcanzar el máximo desarrollo; para determinar el desarrollo se necesita medir cuantitativamente la población de células al tiempo de sembrar y nuevamente después de la incubación. El ciclo de desarrollo de las poblaciones bacterianas es el procedimiento más importante en la multiplicación de los microorganismos (Peoples & Craswell, 1992).

pH: *Azospirillum* sp., tiene un crecimiento óptimo en un rango de pH de 6,5 -7,0. Si el microorganismo no cuenta con el pH correspondiente, esto provocaría la inhibición de su crecimiento y desarrollo (Sánchez, 1964). Para *Azospirillum brasilense*: pH 6,0-7,8; *Azospirillum lipoferum*: pH 5,7-6,8; *Azospirillum amazonense*: pH 5,7-6,5; *Azospirillum halopraeferens*: pH 6,0-8,0; *Azospirillum doebereineriae*: pH 6,0-7,0.

Temperatura: Muchas especies de *Azospirillum* sp., requieren una temperatura óptima de crecimiento cercana a los 30 °C, excepto para *Azospirillum largimobile* que presenta una temperatura de 28 °C y *Azospirillum halopraeferens* 41° C. La modificación de la temperatura, tiene un efecto notable sobre un proceso. Si el valor utilizado no es adecuado puede disminuir o aún impedir la formación de un metabolito determinado. Además, la temperatura puede modificar los requerimientos nutritivos de algunos microorganismos, lo que significa que al modificarse el valor de un factor puede cambiar los requerimientos de otro.

Aireación: Cuando los niveles de oxígeno son bajos, las células de esta bacteria crecen y se multiplican satisfactoriamente, siendo afectadas cuando se presentan altas concentraciones de oxígeno impidiendo que se lleve a cabo el proceso de fijación biológica de nitrógeno. Según la asesoría de la Dra. Vera L. Baldani (Embrapa), para mantener una adecuada multiplicación de este microorganismo se debe tener en cuenta la relación de oxígeno en el medio de cultivo, siendo más favorable la relación 1/5 en investigaciones realizadas sobre bacterias del género *Azospirillum* sp. en Brasil.

Diseño experimental

El diseño de medios de cultivos para el desarrollo de procesos fermentativos es un aspecto de suma importancia. Para ello se utilizan las técnicas de diseño experimental, pues con la mínima cantidad posible de experimentos se puede estudiar la influencia de varios factores y diferentes concentraciones de nutrientes sobre un proceso dado, que puede ser por ejemplo el crecimiento máximo del microorganismo o la producción máxima de metabolitos de interés (Borrego *et al.*, 2004).

El propósito final es deducir la forma en que una serie de variables (factores) que dependen del proceso, afectan a una o varias características (respuestas) de interés (Tye. H, 2004).

Un diseño experimental es una colección de ajustes predeterminados de las variables de un proceso específico, cada variable del proceso se conoce con el nombre de factor experimental mientras que cada combinación de ajustes para las variables de proceso se conoce con el nombre de tratamiento. Una variable de respuesta es una medida de funcionamiento del proceso y cada valor que toma la variable de respuesta se conoce con el nombre de observación (Haaland, 1989).

La experimentación es una estrategia para encontrar respuestas a un problema concreto. Se fundamenta en realizar procesos para generar e interpretar datos con el objetivo de obtener información. En algunos casos concretos, donde se manipula un gran número de

variables, es recomendable el uso de metodologías específicas para generar y analizar datos (Montgomery, 1991).

2.2.5 Diseños factoriales

Un diseño factorial permite estudiar el efecto positivo o negativo que cierto número de variables tienen sobre una determinada propiedad de un sistema experimental. Para ello, las distintas variables o factores a estudiar se fijan en dos o más valores arbitrarios, denominados niveles (Ferré, 2002).

Los diseños factoriales se dividen en dos categorías: completos y fraccionados.

Diseño factorial completo. Se utiliza principalmente cuando el número de factores a estudiar está entre dos y cinco ($2 < k < 5$), rango en el cual su tamaño se encuentra entre cuatro y 32 tratamientos, cantidad manejable en muchas situaciones experimentales.

Diseño factorial fraccionado. Este permite estudiar un número elevado de factores con un número de experimentos mucho menor que los diseños factoriales completos (Dante *et al.*, 2003).

- **Diseño factorial 2^k .** En estos diseños, cada factor se estudia a sólo dos niveles y sus experimentos contemplan todas las combinaciones de cada nivel de un factor con todos los niveles de los otros factores. Los cuales se suelen denotar (+) y (-), en donde k es el número de factores a controlar (Ferré, 2002).
- **Diseño factorial 3^k .** Este es un diseño que consta de k factores con tres niveles cada uno. Los tres niveles de los factores pueden referirse como nivel inferior (-), intermedio (\cdot) y superior (+). La adición de un tercer nivel permite modelar con una relación cuadrática la relación entre la respuesta y cada factor (Ferré, 2002).

Para los diseños fraccionados se mantiene la nomenclatura de 2^{k-p} donde 2 es el número de niveles, k el de factores y p indica el grado de fraccionamiento. En los diseños fraccionados un único valor corresponde a la suma de varios efectos; se dice entonces que estos efectos están confundidos. Estos términos confundidos pueden ser interacciones de dos o más factores. Al nivel de confusiones que presenta un diseño se le denomina resolución, por ejemplo en un diseño de resolución cuatro habrá confusión

entre dos interacciones de dos factores cada una o entre un efecto principal y una interacción entre tres parámetros (Dante *et al.*, 2003).

Diseños para ajustar modelos de primer orden

Una clase de diseños que minimizan la varianza de los coeficientes de regresión son los diseños ortogonales de primer orden. Por ortogonal se entiende que los elementos fuera de la diagonal de la matriz $(x'x)$ son iguales a cero, lo que implica que los productos cruzados de las columnas de la matriz x es igual a cero (Cornell, 1990).

En esta clase de diseños ortogonales de primer orden se incluye:

- **Diseño Plackett-Burman**

El Diseño Plackett-Burman es un caso particular de diseños factoriales fraccionados de resolución III que busca determinar rápidamente cual de los factores tiene un efecto significativo sobre la variable respuesta. Estos diseños son fracciones de arreglos factoriales 2^k . Con este diseño los coeficientes se estiman con máxima precisión a diferencia de los otros diseños ortogonales de primer orden (Montgomery, 1991). En este diseño se estudian $k = n-1$ variables, donde k es el número de factores, n el número de experimentos y múltiplo de 4, es decir, cuando $n = 8, 12, 24, 28, 36 \dots$

$$n = K + 1$$

$$n = \text{Es múltiplo de } 4$$

Cuando $n = 12$ (+,+,+,-,+,-,-,+,-,-). Una segunda columna (B) se genera a partir de la primera (A) moviendo los elementos de la primera columna un renglón hacia abajo y colocando el último signo en la primera posición, así sucesivamente hasta generar la columna K. Un ejemplo de la matriz utilizada para este diseño es mostrado en la Tabla 2.

Modelo de primer orden:

$$Y = \beta_0 + \sum \beta_i X_i$$

Donde Y es la respuesta (biomasa), β_0 es el intercepto del modelo y β_i es el coeficiente estimado para cada variable o factor X_i .

Tabla 2. Matriz Plackett-Burman de 11 factores con 12 tratamientos (Montgomery, 1991). *Response Surface Methodology.*

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

Diseños para ajustar modelos de segundo orden

Para ajustar un modelo de segundo orden deben tenerse al menos tres niveles de cada factor (-1, 0,+1) (Tabla 3). Así como en el diseño de primer orden se requiere la ortogonalidad, en éste se desea que sea un diseño rotatable. Se dice que un diseño es rotatable cuando la varianza de la respuesta predicha en algún punto es función sólo de la distancia del punto al centro y no es una función de la dirección (Montgomery, 1991).

Dado que la finalidad de la metodología de superficies de respuesta es optimizar y desconocemos la localización del óptimo, se utiliza el diseño que proporcione estimaciones precisas en todas las direcciones (Montgomery, 1991).

El diseño Box-Behnken se incluye en esta clase de diseños rotables de segundo orden:

- **Diseño Box-Behnken**

Este diseño se forma combinando factoriales 2^k con diseños de bloques incompletos. El diseño resultante suele ser más eficiente en la estimación de los coeficientes de primer y segundo orden (Montgomery, 1991). La representación geométrica de este diseño se observa en la figura 3.

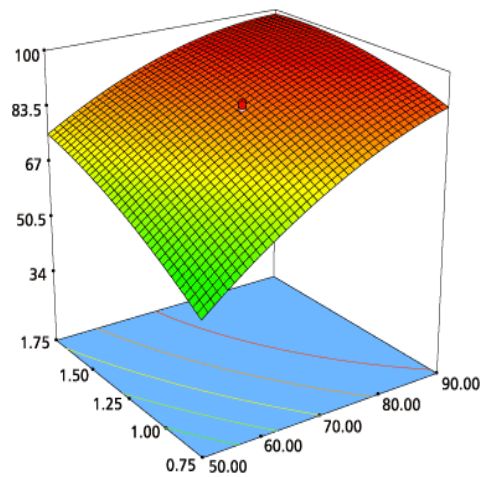


Figura 3. Superficie de respuesta. Diseño Box-Behnken para tres niveles de evaluación (Montgomery, 1991).

Tabla 3. Diseño Box-Behnken para tres niveles de concentración de fuentes nutricionales (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

2.3 MARCO CONCEPTUAL

***Azospirillum* sp.:** El género *Azospirillum* sp., pertenece a la subclase alfa de las proteobacterias (Young, 1992). El nombre de *Azospirillum* sp., proviene del francés *Azote*: que significa nitrógeno y del grupo *Spirillum*: pequeña espiral. Presenta un gran potencial como biofertilizante al incrementar la producción de granos en cultivos de gramíneas, provocando un aumento en el número y longitud de los pelos radicales por la secreción de fitohormonas como auxinas, citoquininas y gibberelinas ocasionando mayor captación de nutrientes y mejora en el balance hídrico de la planta (Baldani *et al.*, 1979).

Biofertilizante: Producto biológico con base en microorganismos del suelo, elementos minerales y sustancias orgánicas que, al ser inoculado, aumenta sus concentraciones en el mismo, haciendo disponibles los nutrientes para las plantas (Bonilla *et al.*, 2000).

Biomasa: Suma total de materia de los seres vivos que viven en un ecosistema determinado, expresada habitualmente en peso estimado por unidad de área o volumen (Torres & Yepes, 2007).

Diazótrofo: Significa consumidor de nitrógeno atmosférico y hace referencia a la capacidad de algunos géneros bacterianos de reducir el N_2 a NH_3^+ en un proceso conocido como fijación biológica de nitrógeno. (Dôbereiner *et al.*, 1995)

Diseño de experimentos estadísticos: Proceso de planificación de un experimento con objeto de obtener datos apropiados, analizables mediante métodos estadísticos, de forma que se puedan conseguir conclusiones válidas y objetivas (Montgomery, 1991).

Medio de cultivo: Cualquier material que presente una adecuada combinación de nutrientes para permitir el crecimiento o el aumento del número de células de una población microbiana (Torres & Yepes, 2007).

Optimización: Mejorar los procesos en términos de eficiencia y eficacia con el objeto de incrementar la productividad encontrando una solución que represente un valor óptimo para una función objetivo (Montgomery, 1991).

2.4 MARCO CONTEXTUAL

El proyecto se desarrollará en los Laboratorios de Microbiología de Suelos, del Centro de Biotecnología y Bioindustria CBB, ubicados en la Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria –Corpoica Tibaitatá-, Kilómetro 14, vía Mosquera, Cundinamarca.

2.5 MARCO LEGAL

Constitución Política de Colombia. Esta investigación está facultada por los artículos 27, 67 y 71 en los cuales se garantiza la libertad de la investigación y búsqueda del conocimiento. Además de las libertades establece también la de expresar y difundir sus pensamientos (Art. 73), la regulación por parte del Estado del control de calidad de los productos ofrecidos (Art. 78), de igual forma el derecho que tienen las personas de gozar de un ambiente sano (Art. 79), el manejo y aprovechamiento de los recursos naturales para garantizar su desarrollo sostenible, su conversión, restauración o sustitución (Art. 80).

- **RESOLUCIÓN NÚMERO 00074 del 4 Abril del 2002 MINISTERIO DE AGRICULTURA Y DESARROLLO RURAL**

CAPITULO VI. Procedimiento para evaluar la conformidad.

Además de cumplir con la legislación nacional vigente ante la Superintendencia de Industria y Comercio, los organismos de certificación de productos agropecuarios ecológicos al realizar el proceso de certificación deberán realizar el procedimiento sobre la base del presente reglamento y como mínimo evidenciar, además del cumplimiento de los requisitos legales vigentes aplicables, el cumplimiento de las siguientes disposiciones: Componente agrícola.

Artículo 32. Conversión a la producción agropecuaria ecológica. El inicio del período de conversión será a partir de la fecha de inscripción del productor ante el organismo de certificación, la cual debe quedar registrada en el primer informe resultado de la visita inicial de evaluación junto con la fecha en que por última vez se hayan aplicado a lo largo del sistema de producción insumos cuya utilización sea incompatible con los señalados en el presente reglamento.

Superintendencia de Industria y Comercio: Organismo nacional de acreditación de organismos de certificación, inspección y laboratorios de pruebas y ensayos, según Decreto número 2269 de 1993.

Artículo 33. Mantenimiento del suelo. El organismo de certificación deberá exigir al productor, por escrito el plan de producción en el que se incluya el programa de mantenimiento del suelo.

Artículo 34. Manejo fitosanitario y de Arvenses. El organismo de certificación deberá exigir al productor por escrito, las previsiones a tomar en materia de insumos para el manejo fitosanitario y de arvenses en el caso en que se llegaren a presentar inconvenientes en este sentido

Artículo 35. Insumos permitidos. El organismo de certificación deberá verificar y evidenciar el control sobre las anotaciones y/o registros del productor necesarios para localizar el origen, la naturaleza y las cantidades de todos los insumos y/o materias primas adquiridas, así como conocer la utilización que se ha hecho de las mismas.

Artículo 36. Control a la producción. El organismo de certificación deberá verificar y evidenciar los registros del productor relativos a la naturaleza, las cantidades y los destinatarios de todos los productos del sistema productivo que hayan salido de la Unidad y/o planta procesadora, tratando de garantizar una completa trazabilidad del

producto certificado. Cuando exista producción paralela, el productor deberá notificar con anticipación, al organismo de certificación, la fecha de cosecha, y/o procesamiento y el volumen obtenido.

Artículo 37. Almacenamiento. El organismo de certificación deberá verificar que en la unidad de producción no se almacenen materias primas, insumos y/o productos no admitidos en el presente reglamento.

Artículo 39. Organismos vivos modificados genéticamente. El organismo de certificación deberá como mínimo evidenciar que los productores han exigido a los proveedores de semillas y/o insumos una declaración de que no provienen de organismos vivos modificados genéticamente o derivados de ellos.

- **Resolución 00375 de 2004.** Por la cual se dictan las disposiciones sobre el registro y control de los bioinsumos y extractos vegetales de uso agrícola en Colombia.

CAPÍTULO I. DEL OBJETO Y CAMPO DE APLICACION

Artículo 1. Es objeto de la presente Resolución:

a) Orientar la producción, importación, exportación, comercialización, uso y manejo adecuado y racional de los Bioinsumos y Extractos Vegetales de uso agrícola para prevenir y minimizar daños a la salud humana, la sanidad agropecuaria y el ambiente bajo las condiciones autorizadas y para facilitar el comercio nacional e internacional.

b) Establecer requisitos y procedimientos unificados y armonizados con reglamentaciones internacionales vigentes, para el registro y el control legal y técnico de los Bioinsumos y Extractos Vegetales de uso agrícola, especialmente en lo relacionado con terminología, clasificación, composición garantizada, rotulado y parámetros para verificación de la conformidad.

Artículo 2. La presente Resolución aplica a los Bioinsumos y Extractos Vegetales de uso agrícola que se produzcan en Colombia o que sean importados como a sus materias primas, ya sea para su comercialización en el ámbito agrícola o para uso directo por parte de las empresas interesadas.

PARÁGRAFO 1. Se excluyen de esta Resolución los Organismos Modificados Genéticamente (OMG) y los extractos vegetales catalogados como extremada y altamente tóxicos

PARÁGRAFO 2. Los contenidos de las Normas citadas en la presente Resolución, deberán ser revisados y actualizados por el ICA, de conformidad con lo establecido en la Resolución No. 3742 de la Superintendencia de Industria y Comercio o aquellas que la modifiquen, sustituyan o adicione y de acuerdo con los avances científicos y tecnológicos sobre la materia.

Resolución Número 1115 del 1 de noviembre del 2000 del Ministerio del Medio Ambiente. Por medio de la cual se determina el procedimiento para el registro de colecciones biológicas con fines de investigación científica.

Artículo 1. Del registro de colecciones biológicas con fines de investigación. Toda persona natural o jurídica que posea una colección biológica cuyo objeto implique en forma total o parcial actividades de investigación científica, existente antes de la entrada en vigencia del decreto 309 del 25 de Febrero de 2000, así como las que se organicen con posterioridad a dicho decreto, deberá registrarla ante el INSTITUTO DE INVESTIGACIÓN DE RECURSOS BIOLÓGICOS "ALEXANDER VON HUMBOLDT" de acuerdo con el procedimiento que se establece en la presente resolución.

Artículo 2. Solicitud de registro. La solicitud de registro de una colección biológica con fines de investigación científica deberá presentarse ante el INSTITUTO DE INVESTIGACIÓN DE RECURSOS BIOLÓGICOS "ALEXANDER VON HUMBOLDT" dentro del formato anexo a esta resolución, el cual hace parte integral de la misma.

Artículo 7. Facultades de las colecciones biológicas registradas. Las colecciones biológicas registradas están facultadas para prestar asesoría en las investigaciones científicas y demás estudios que se requieran para efectos de catalogar, mantener y organizar taxonómicamente especímenes obtenidos legalmente. Así mismo servirán como referencia en la identificación de especímenes de la diversidad biológica dentro de los estudios ambientales e inventarios de biodiversidad.

- **NORMAS DEL INSTITUTO COLOMBIANO DE AGRICULTURA (ICA)**

Materia de Insumos Agrícolas

Dentro de las obligaciones legales para soportar la investigación se revisaron las resoluciones correspondientes a la normatividad designada por el Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural junto con el ICA (Instituto Colombiano de Agricultura), quien otorga la resolución No 00150 del 21 de enero de 2003, por la cual se adopta el Reglamento Técnico de Fertilizantes y Acondicionadores de Suelos para Colombia. En donde se mantiene actualizadas las normas bajo las cuales se debe regir toda persona natural o jurídica que se dedique en Colombia a la importación, fabricación, formulación, envasado, distribución, expendio, uso y aplicación de fertilizantes y acondicionadores de suelos.

El **artículo 29°** menciona los nombres comerciales de los fertilizantes y acondicionadores de suelos que se comercializan en Colombia, los cuales deberán ajustarse a términos de moderación técnica y científica y corresponder a las características de uso del producto. La Resolución 074 de 2002, emitida por el Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural. Indica que los biofertilizantes con nombres que empiecen con el prefijo Bio únicamente podrá ser utilizado en acondicionadores orgánicos registrados para agricultura ecológica, que involucren microorganismos en su composición (ICA, 2003). El género *Azospirillum* sp. según ICA (artículo 1°) se encuentra incluida entre las bacterias fijadoras de nitrógeno (ICA. 1999).

3. DISEÑO METODOLÓGICO

3.1 TIPO DE INVESTIGACIÓN

La investigación es de tipo experimental, se desarrollaron dos fases: fase I. Laboratorio y una fase II donde se aplicaron los modelos estadísticos. Se manejó una hipótesis nula (eficiencia en la producción de biomasa de *Azospirillum brasilense* C16 empleando fuentes de crecimiento alternativas de bajo costo).

3.2 POBLACIÓN Y MUESTRA

3.2.1 POBLACIÓN: Los tratamientos a diferente concentración de las fuentes de crecimiento que fueron sometidos simultáneamente a los modelos estadísticos experimentales (aplicando el Diseño Plackett-Burman)

3.2.2 MUESTRA: La cantidad específica de los sustratos que presentaron mejores resultados en el Diseño Plackett-Burman, fueron utilizados como fuentes nutricionales aplicando el diseño de optimización Box-Behnken.

3.3 FASES DE LA INVESTIGACIÓN

3.3.1 FASE I: CONFORMACIÓN BANCO DE CEPAS Y DETERMINACIÓN DE LA CINÉTICA DE CRECIMIENTO DE LA BACTERIA *Azospirillum brasilense* C16.

- **Microorganismo utilizado**

La cepa bacteriana empleada en esta investigación hace parte del Banco de cepas del Laboratorio de Microbiología de suelos del C.I Tibaitatá de la Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria-Corpoica, obtenida por Cárdenas (2007), la cual fue aislada de suelos cultivados con pasto Guinea (*Panicum maximum* jacq) en la Estación Experimental Motilonia en el Valle del Cesar Municipio de Codazzi, reportada como una bacteria que contribuye al incremento de la productividad y calidad nutricional de este tipo de gramínea al segregar sustancias promotoras del crecimiento aumentando la densidad y longitud de los pelos radicales. Esta cepa fue caracterizada e identificada genéticamente como *Azospirillum brasilense*, en EMBRAPA Agrobiología (Empresa brasilera de investigación agropecuaria) y codificada como Cepa C16.

- **Reactivación de la cepa**

La reactivación de *A. brasilense* C16 se realizó a partir de un tubo Eppendorf[®] criopreservado utilizando el método por agotamiento en medio rojo Congo (Rodríguez-Cáceres, 1982) y batata. Las cajas fueron incubadas durante 48 horas a $30 \pm 2^\circ\text{C}$. (Figura 4).



Figura 4. Identificación de *A. brasilense* C16 en medio Rojo Congo (Rivera, 2008)

- **Descripción fenotípica**

Se realizaron tinciones de Gram, para verificar la pureza de *A. brasilense* C16 en estudio (Figura 5).



Figura 5. Morfología celular *Azospirillum brasilense* observada mediante el microscopio óptico Olympus cx41 con el objetivo de 100x (Rivera, 2008).

- **Estandarización del inóculo**

Partiendo de una siembra de *A. brasilense* C16 en el medio de cultivo Dygs para obtención de biomasa, se preparó el inóculo suspendiendo la bacteria en solución salina

al 0,85% (p/v). Esta suspensión fue ajustada al tubo N° 5 de la escala de Mc Farland, el cual fue verificado mediante la lectura de absorbancia utilizando el Espectrofotómetro DU® serie 530 Life Science de la unidad de genética molecular y mediante la cuantificación simultánea de Unidades Formadoras de Colonia (UFC/ml) por el método de diluciones seriadas en base10 y recuento en placa por la técnica de microgota (Doyle M. *et al.*, 2001). El valor absorbancia del tubo N° 5 es de 0,568 nm (Anexo 5) lo que corresponde a 7,64 Log 10 UFC/ml.

- **Banco de trabajo**

Se realizó una suspensión celular al 10% del microorganismo en solución salina (NaCl 0,85%) ajustándolo con el tubo N° 5 en la Escala de Mc Farland (Protocolo Lab. Microbiología de Suelos). La suspensión fue agregada al medio de cultivo Dygs incubándose durante 48 horas, a 30 ± 2 °C y 120 rpm. Posterior a la incubación se combinó el caldo de fermentación en una proporción de 70:30% (v/v) del inóculo con el glicerol que se utilizó como agente anticoagulante biológico. Posteriormente, se agregó 1ml de la mezcla en tubos Eppendorf® estériles y se conservó a -20 °C (Figura 6). Se verificó la concentración celular por medio de un recuento en placa por la técnica de microgota (Doyle M. *et al.*, 2001) y la viabilidad basado en el método ecométrico (Doyle M. *et al.*, 2001) a las 72 horas. El método ecométrico consiste en dividir en cuatro cuadrantes la caja de petri y en cada cuadrante se realiza una siembra en líneas paralelas, cada línea de crecimiento equivale al 5%, indicando viabilidad un resultado del 100%. Estos viales fueron utilizados como banco primario, banco de trabajo y banco piloto para el desarrollo de la investigación. La estabilidad enzimática de *Azospirillum brasilense*, se realizó mediante la cuantificación de la capacidad de la bacteria de reducir acetileno (ARA) para confirmar que el método de conservación utilizado mantuvo la estabilidad del microorganismo durante el desarrollo de la investigación.



Figura 6. a) Almacenamiento de *A. brasilense* C16 mantenidos a -20 °C

b) Viales de banco de trabajo mantenidos a -20 °C (Rivera, 2008).

- **Cinética comparativa entre el medio de referencia y el medio alternativo para el crecimiento de *A. brasilense* C16.**

Se realizó la cinética de crecimiento de *A. brasilense* C16 en el medio de referencia Dygs. Esto constituyó un punto de partida para realizar una comparación entre las curvas de crecimiento del medio de referencia y el medio optimizado.

La curva de crecimiento se realizó en un erlenmeyer de 2 L de capacidad con un volumen de trabajo de 400 mL de medio líquido con una agitación de 120 rpm y $30 \pm 2^\circ\text{C}$. Se efectuaron muestreos desde la hora 0 y posteriormente cada 3 horas hasta completar 60 horas con el fin de determinar los valores óptimos de concentración de *A. brasilense* C16. El ensayo se realizó por triplicado y se utilizó el Espectrofotómetro DU[®] serie 530 Life Science de la unidad de Genética Molecular del Centro de Biotecnología y Bioindustria (CBB) para registrar las lecturas de absorbancia a 559 nm (Figura 7); al mismo tiempo se realizó recuento en placa por la técnica de microgota. Los parámetros cinéticos evaluados fueron concentración de biomasa y pH.



Figura 7. Espectrofotómetro DU[®] serie 530 Life Science

- **Parámetros evaluados**

Determinación de biomasa

La determinación de UFC/ml (biomasa) se realizó por el método de diluciones seriadas en base 10 y recuento en placa por la técnica de microgota (Doyle M. *et al.*, 2001). Las diluciones decimales se efectuaron desde la dilución 10^{-2} hasta 10^{-9} . Para el recuento en placa se dividió la caja de Petri (con medio batata) en cuatro cuadrantes y se inocularon 20 μl de la muestra en la superficie dejando secar las gotas, consecutivamente se incubaron a $30 \pm 2^\circ\text{C}$ durante 48 horas para su posterior lectura y recuento.

Se calculó el número de UFC/ml aplicando la siguiente fórmula:

$$\text{UFC/ml} = N \times D \times 50$$

N= Número de colonias en caja; D= Factor de dilución; 50= Factor de corrección

Determinación de pH

La determinación de pH se realizó mediante un potenciómetro (Hanna instruments pH211[®]) siguiendo el protocolo del Laboratorio de Microbiología de Suelos.

Durante la curva se determinó y calculó parámetros cinéticos, entre ellos la velocidad específica de crecimiento y el tiempo de crecimiento de *A. brasilense* C16 en el medio de referencia, con el fin de analizar el comportamiento del microorganismo con base en los parámetros fijados durante el desarrollo del proceso.

3.3.2 FASE II: APLICACIÓN MODELOS ESTADÍSTICOS EXPERIMENTALES

Para el diseño inicial del medio de cultivo se tomó como referencia el medio Dygs (Rodríguez Neto *et al.*, 1986) que ha sido utilizado en la multiplicación de bacterias del género *Azospirillum* sp. Se estudiaron: fuentes de carbono, fuentes de nitrógeno, microelementos, sales y factores físicos como la aireación y agitación con el propósito de determinar los elementos que afectan significativamente el crecimiento del microorganismo.

De acuerdo al metabolismo de la bacteria se seleccionaron las fuentes de crecimiento más influyentes sobre el desarrollo del microorganismo manteniendo una adecuada relación de C/N en el medio de cultivo. *A. brasilense* presenta diferentes vías de degradación de las fuentes de carbono dentro de las cuales participan el ciclo de Krebs y las rutas metabólicas de Embden-Meyerhof-Parnas y Entner-Doudoroff. Y para la degradación de fuentes nitrogenadas sigue las rutas de animación y transaminación (Westby *et al.*, 1983).

El diseño del medio de cultivo para la *A. brasilense* C16, se realizó en dos etapas: 1) Etapa exploratoria mediante el Diseño Plackett-Burman y 2) Etapa de Optimización;

como variable de respuesta se seleccionó el crecimiento celular expresado como UFC/ml.

Los medios de cultivo fueron esterilizados en autoclave durante 15 min. a 121°C y 15 psi. Todas las fermentaciones se llevaron a cabo en erlenmeyers de 125 ml, conteniendo un volumen de medio según la relación de aireación de acuerdo al diseño de experimentos utilizado, con un pH de 6,8-7.0. Para la preparación del inóculo, se realizó una suspensión celular al 10% del microorganismo en solución salina (NaCl 0,85%) ajustándolo con el tubo N° 5 de Escala de Mc Farland (Protocolo Lab. Microbiología de Suelos). Una vez inoculados los erlenmeyers se llevaron a un agitador horizontal LAB-LINE® Orbit, a una temperatura de 30 ±2°C y una agitación de acuerdo al diseño experimental a utilizar (Figura 8).

Antes de empezar la inoculación de *A. brasilense* C16 en los tratamientos, se realizó un recuento en placa de la suspensión celular para determinar la concentración inicial mediante un recuento en placa por la técnica de microgota (Doyle M. *et al.*, 2001).



Figura 8. Tratamientos diseño experimental, en un agitador horizontal LAB-LINE® Orbit.

- **Diseño Plackett-Burman**

Para iniciar el estudio se aplicó una etapa preliminar exploratoria usando un diseño Plackett-Burman con el fin de determinar las fuentes de crecimiento y factores físicos que afectan el crecimiento celular de *A. brasilense* C16.

El diseño experimental se implementó con 14 tratamientos por triplicado, de los cuales 2 fueron los controles: el medio Dygs (13) y el medio alternativo a la mitad (14). Se determinó evaluar 9 factores nutricionales: cuatro fuentes de carbono (C1, C2, C3 y C4), dos fuentes de nitrógeno (N1 y N2), dos sales (S1 y S2), solución de

microelementos (K) y dos factores físicos: aireación (I) y agitación (J) (Tabla 5). Cada factor se evaluó a dos niveles: un nivel alto denotado por (+) y un nivel bajo designado por (-) (Tabla 6). El análisis de los datos obtenidos se llevó a cabo mediante el análisis de varianza (*Anova*), para determinar los factores más significativos sobre la variable respuesta.

Las fuentes de crecimiento fueron sometidas a una caracterización química en el Laboratorio de Suelos, Agua y Foliar de Corpoica, siguiendo protocolos previamente estandarizados. Se determinó el porcentaje de carbono orgánico por el método de Walkley-Black modificado y nitrógeno total por el método Kjeldahl; esto con el fin de determinar la relación C/N, y de esta manera no afectar el metabolismo de la bacteria en estudio. La tabla se presenta en el Anexo D; y para los demás sustratos se utilizó la ficha técnica establecida para las fuentes a evaluar.

La codificación de cada uno de las fuentes de crecimiento y factores físicos se realizó de acuerdo a las normas establecidas por el laboratorio de Microbiología de Suelos del Centro de Biotecnología y Bioindustria (CBB).

El diseño experimental se basa en un modelo de primer orden:

$$Y = \beta_0 + \sum \beta_i X_i \quad \text{[Ec.1]}$$

Donde Y es la respuesta (Biomasa) β_0 es el intercepto del modelo y β_i es el coeficiente estimado para cada variable o factor X_i .

Tabla 5. Matriz experimental Plackett-Burman para el diseño de un medio de cultivo para *A. brasilense* C16.

Tratamientos Factores codificados	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13 (M. Ref)	14 (Me dio)
S1	+	+	-	+	+	+	-	-	-	+	-	-		
S2	-	+	+	-	+	+	+	-	-	-	+	-		
C1	+	-	+	+	-	+	+	+	-	-	-	-		
C2	-	+	-	+	+	-	+	+	+	-	-	-		
C3	-	-	+	-	+	+	-	+	+	+	-	-		
C4	-	-	-	+	-	+	+	-	+	+	+	-		
N1	+	-	-	-	+	-	+	+	-	+	+	+		
N2	+	+	-	-	-	+	-	+	+	-	+	-		
(I)	+	+	+	-	-	-	+	-	+	-	+	-		
(J)	-	+	+	+	-	-	-	+	-	+	+	-		
(K)	+	-	+	+	+	-	-	-	+	-	+	-		

Las magnitudes de los puntos de referencia o puntos cero se definieron mediante un análisis bibliográfico para procesos similares, de igual manera los deltas o incrementos para obtener los valores de los niveles, aplicando la siguiente ecuación:

$$\text{Nivel } (-)_j = \text{Nivel } (0)_j - \Delta/2_j$$

$$\text{Nivel } (+)_j = \text{Nivel } (0)_j + \Delta/2_j \quad \text{[Ec.2]}$$

Donde: Nivel (0), es el punto de referencia para el factor j, determinado a partir de la información previa obtenida. Δ es el delta o magnitud de diferencia a evaluar experimentalmente, este valor se seleccionó de tal forma que permitió inferir con claridad los efectos de cada factor j. Nivel (-), es el nivel bajo para el factor j. Nivel (+), es el nivel alto para el factor j.

Tabla 6. Factores analizados mediante un Diseño Plackett-Burman y codificación de los niveles utilizados para las distintas fuentes nutricionales.

FACTOR	CODIFICACIÓN	NIVELES DEL FACTOR	
		NIVEL BAJO (-)	NIVEL ALTO (+)
Sal	S1	0,25 g/L	0,75 g/L
Sal	S2	0,25 g/L	0,75 g/L
Fuente de carbono	C1	1 g/L	3 g/L
Fuente de carbono	C2	0,675 g/L	2,025 g/L
Fuente de carbono	C3	0,74625 g/L	2,23875 g/L
Fuente de carbono	C4	0,98 g/L	2,94 g/L
Fuente de nitrógeno	N1	0,721 g/L	2,163 g/L
Fuente de nitrógeno	N2	0,848 g/L	2,544 g/L
Aireación	I	1/5	2/5
Agitación	J	60 rpm	180 rpm
Microelementos	K	0,5 ml/L	1,5 ml/L

- **Etapas de optimización aplicando un Diseño Box-Behnken**

Teniendo en cuenta los factores significativos en el Diseño Plackett-Burman, se llevó a cabo el diseño de optimización utilizando un nivel alto, medio y bajo de los tres factores más influyentes sobre el crecimiento del microorganismo, determinando de esta manera el nivel óptimo de cada variable independiente; para el desarrollo de este experimento se utilizó el Diseño planteado por Box-Behnken, que permitió evaluar los efectos cuadráticos y las interacciones de orden superior entre las variables y determinar la naturaleza no lineal de la respuesta. Como punto central se utilizó el tratamiento en el cual se alcanzó la mejor respuesta en cuanto al crecimiento de *Azospirillum brasilense*. Los demás componentes y condiciones se dejaron fijas de acuerdo al mismo tratamiento

Para los cálculos estadísticos, el comportamiento de la producción de biomasa fue explicado por la siguiente ecuación cuadrática:

$$Y = \beta_0 + \sum \beta_i X_i + \sum \beta_{ij} X_i^2 + \sum \beta_{ij} X_i X_j \quad [\text{Ec.3}]$$

Donde Y es la respuesta (Biomasa), los subíndices i,j varían desde 1 al número de variables, β_0 es el intercepto, β_i son los coeficientes lineales, β_{ij} son los coeficientes cuadráticos. La ecuación fue resuelta utilizando el paquete estadístico STATGRAPHICS Plus versión 5.1 para estimar la respuesta de la variable independiente. El estadístico F se usó para evaluar la significancia del modelo.

En el diseño experimental se implementaron 15 tratamientos por triplicado. La matriz experimental se presenta en la tabla 7.

Tabla 7. Diseño experimental Box-Behnken para *A. brasilense* C16 (Montgomery, 1991).

Factores Codificados			
Tratamientos	A	B	C
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

3.6 INSTRUMENTOS

Para la información requerida en esta investigación se acudió a:

Consultas de artículos científicos en revistas de investigación como: Journal of Bacteriology, Science Direct (Elsevier), Springer Link, High Wire, Hinari, Agora, Agris y Agriculture Journals.

Revisión bibliográfica en la base de datos de la Pontificia Universidad Javeriana y en la Biblioteca Agropecuaria de Colombia.

Consultas a profesionales del Laboratorio de Control Biológico del Centro de Biotecnología y Bioindustria-CBB. y del Departamento de Biometría.

Capacitación con la Dra. Vera Lucía Baldani (Embrapa) sobre el género *Azospirillum* sp.

3.8 TÉCNICAS DE ANÁLISIS

De acuerdo a los resultados obtenidos en las diferentes etapas de la investigación, la información se registró en tablas y cuadros que fueron analizados empleando paquetes estadísticos (STATGRAPHICS Plus versión 5.1. SAS versión 9.0), que permitieron visualizar el crecimiento de la bacteria en función de los parámetros de medición evaluados de manera cualitativa y cuantitativa.

4. RESULTADOS Y DISCUSIONES

En el banco de trabajo la viabilidad celular no disminuyó significativamente y el método de criopreservación utilizado no afectó la fisiología del microorganismo. Así mismo, durante la investigación se realizó la prueba de reducción de acetileno (ARA) para la cepa C16 al iniciar el banco y después de criopreservarlo mostrando un comportamiento promedio de $118,35 \text{ nmol C}_2\text{H}_4 \text{ h}^{-1} \text{ mL}^{-1}$. Además, se mantuvo la pureza al 100% y la concentración del glicerol utilizada (30%) no afectó el mantenimiento de *Azospirillum brasilense* C16 por lo que la evaluación del recuento en UFC/mL no disminuyó ninguna unidad logarítmica. De esta manera, se puede asegurar que bajo las condiciones de laboratorio, este compuesto sirvió como crioprotectante para la preservación de la bacteria.

4.1 CINÉTICA DE CRECIMIENTO *Azospirillum brasilense* C16.

4.1.1 MEDIO DE REFERENCIA (Medio Dygs)

La curva muestra detalladamente los valores obtenidos en la fermentación en un tiempo de 60 horas, a 120 rpm con una temperatura de $30 \pm 2^\circ\text{C}$, se observa un incremento de dos exponentes respecto a la concentración inicial en el medio de cultivo convencional.

La curva de crecimiento de *A. brasilense* C16 en el medio de cultivo de referencia (Figura 9) inició en 8,3 Log UFC/mL, presentando un crecimiento exponencial hasta las 24 horas con un valor de 10,25 Log UFC/mL, seguido de una fase de descenso entre la hora 24 y 33 para finalmente alcanzar una fase estacionaria desde la hora 39 en adelante donde permanece constante la concentración celular.

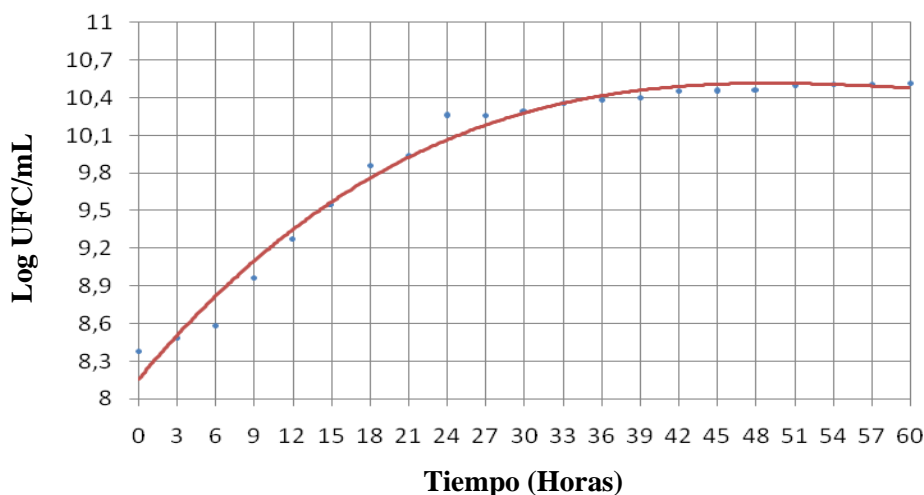


Figura 9. Cinética de crecimiento para *A. brasilense* C16 en función del tiempo en el medio de cultivo de referencia.

En primer lugar, se realizó la linealización de la curva de crecimiento aplicando el método de mínimos cuadrados para obtener la recta de regresión desde la hora 0 hasta la hora 30 (ver Figura 10) debido a que en este intervalo de tiempo finaliza la fase exponencial y se presenta el mayor valor del estadístico R^2 .

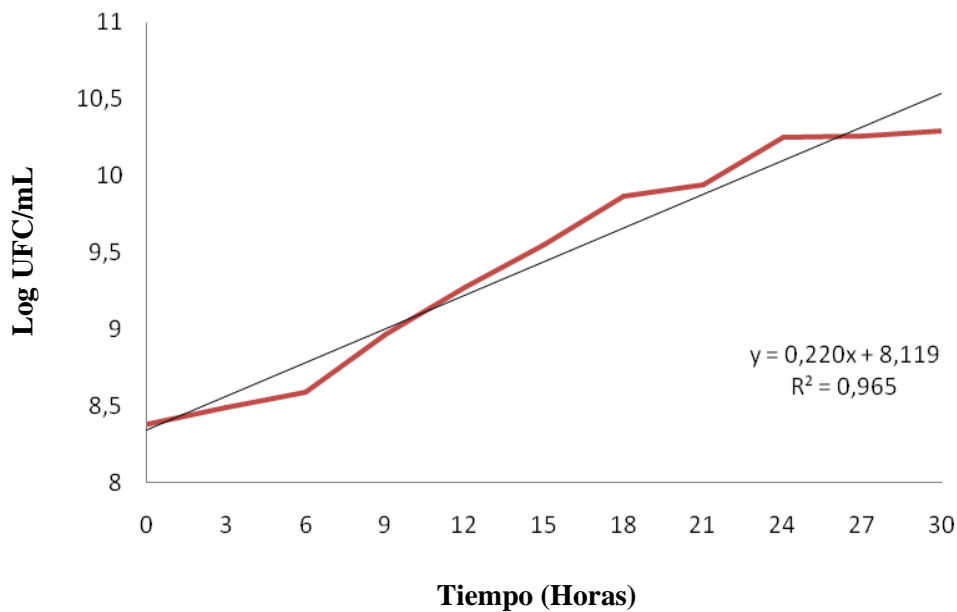


Figura 10. Linealización de la curva de crecimiento para *A. brasilense* C16 en el medio de cultivo de referencia.

La ecuación de regresión obtenida fue:

$$y = 0,220x + 8,119; R^2 = 0,965$$

Los resultados revelan que existe una relación estadísticamente significativa ($p < 0,01$) entre las variables. El valor de coeficiente de correlación R^2 , indica que el modelo explica el 96,5% de variabilidad de la variable dependiente, por lo que aumenta la confiabilidad del análisis realizado. Así mismo, se puede asegurar que la cinética es de orden 1, por lo que el microorganismo responde a una cinética de tipo exponencial y se presenta mediante la siguiente ecuación:

Velocidad volumétrica de producción de biomasa: $rx = \mu x$

[Ec.4]

$$rx = dx/dt$$

Integrando la ecuación se obtiene la expresión:

$$X = X_0 e^{\mu t} \quad [\text{Ec.5}]$$

X = Concentración de células viables

X_0 = Concentración de células en un tiempo cero

μ = Velocidad específica

t = tiempo

Tomando logaritmos neperianos:

$$\ln X = \ln X_0 + \mu t \quad [\text{Ec.6}]$$

De acuerdo a lo anterior se calculó la velocidad específica de crecimiento (μ_x) y el tiempo de duplicación para la fase exponencial. La expresión del tiempo de duplicación se obtuvo de la ecuación 5 y se transformó en:

$$t_d = \ln 2 / \mu_x \quad [\text{Ec.7}]$$

El resultado de la velocidad específica de crecimiento para *A. brasilense* C16 en el medio Dygs fue de $\mu_x = 0.220 \text{ h}^{-1}$, para alcanzar una concentración máxima de células de 1.83×10^{10} UFC/mL al final del proceso de multiplicación y el tiempo necesario para que la población de *A. brasilense* C16 se duplique fue de 3,15 horas.

4.2 DISEÑO DE UN MEDIO DE CULTIVO

4.2.1 Etapa exploratoria (I)

Los resultados de las lecturas del recuento Log UFC/ml se presentan en la Tabla 8. Los mejores tratamientos fueron el 3, el 1 y el 12, los cuales mostraron una concentración promedio entre 9,51 Log 10 de UFC/ml, 9,18 Log 10 de UFC/ml y 9,16 Log 10 de UFC/ml con un coeficiente de variación (CV) entre 0,33%, 0,70% y 0,26% entre las réplicas respectivamente. Los tratamientos 5, 6 y 11 presentaron los menores valores promedio del recuento en Log UFC/ml entre 9,03 Log 10 de UFC/ml, 9,04 Log 10 de UFC/ml y 9,05 Log 10 de UFC/ml respectivamente, esto puede ser atribuido a la relación de las magnitudes evaluadas que no permitieron que el microorganismo metabolizara los nutrientes de forma correcta y de esta manera se agotaron las diferentes coenzimas u otros constituyentes celulares que impidieron el crecimiento de *A. brasilense* C16, sumado a lo anterior también pudo ser la sensibilidad de la técnica de cuantificación aplicada.

Tabla 8. Número de células (Log UFC/ml) obtenidos aplicando un diseño Plackett-Burman para *A. brasilense* C16.

PLACKETT BURMAN							
Tratamientos	Réplicas recuento			Media aritmética	Desviación estándar	Coeficiente de variación	Varianza
	1	2	3				
1	9,24	9,18	9,11	9,18	0,064562212	0,70%	0,0042
2	9,24	9,13	8,98	9,12	0,133156468	1,46%	0,0177
3	10,20	9,18	9,15	9,51	0,602368632	0,33%	0,3628
4	9,06	9,13	9,19	9,13	0,064876615	0,71%	0,0042
5	8,93	9,02	9,13	9,03	0,100582545	1,11%	0,0101
6	9,02	9,00	9,10	9,04	0,050947953	0,56%	0,0026
7	9,15	9,04	9,22	9,14	0,088571337	0,97%	0,0078
8	9,15	9,13	9,00	9,09	0,080197416	0,88%	0,0064
9	9,06	9,19	9,08	9,11	0,070120131	0,77%	0,0049
10	9,18	9,16	9,11	9,15	0,032476232	0,35%	0,0011
11	9,00	9,06	9,08	9,05	0,041423693	0,46%	0,0017
12	9,16	9,13	9,18	9,16	0,023358246	0,26%	0,0005

A partir de los datos obtenidos se aplicó un análisis de varianza (*Anova*) y se dilucidó el efecto de cada uno de los factores evaluados (Tabla 9).

Tabla 9. Análisis de varianza (*Anova*) de los resultados obtenidos para determinar los valores de estadístico P, con un nivel de confianza del 95% del diseño experimental Plackett-Burman.

Factor	Símbolo	Estimación	P-valor
Sal	S1	-0,0694444	0,2796
Sal	S2	0,0105556	0,8677
Fuente de carbono 1	C1	0,0794444	0,2179
Fuente de carbono 2	C2	-0,0783333	0,2242
Fuente de carbono 3	C3	0,0283333	0,6555
Fuente de carbono 4	C4	-0,0783333	0,2242
Fuente de nitrógeno 1	N1	-0,0716667	0,2649
Fuente de nitrógeno 2	N2	-0,0872222	0,1777
Aireación	I	0,118333	0,0721
Agitación	J	0,0661111	0,3027
Microelementos	K	0,0505556	0,4282

Se determinaron los valores de P, con un nivel de confianza del 95%. Los datos para cada uno de los factores analizados no presentaron efectos estadísticamente significativos sobre la variable respuesta ($p < 0,05$). Los resultados en negrilla corresponden a los factores que mostraron una significancia sobre el crecimiento del microorganismo. Mientras, que se descartaron los factores: Sal (S2), fuente de carbono (C3) y la solución de microelementos (K) por presentar valores de P mayores.

De acuerdo a los resultado obtenidos, se realizó un análisis matemático (ver Anexo F) reemplazando los coeficientes de regresión para cada factor en la ecuación 1 y se estableció el modelo de ajuste de regresión para la productividad en células (Y).

La ecuación del modelo ajustado es:

$$Y = 9,14083 - 0,0347222S1 + 0,00527778S2 + 0,0397222C1 - 0,0391667C2 + 0,0141667C3 - 0,0391667C4 - 0,0358333N1 - 0,0436111N2 + 0,0591667I + 0,0330556J + 0,0252778K$$

Donde Y es la variable de respuesta, S1 y S2 son sales, C1, C2, C3 y C4 son fuentes de carbono N1 y N2 son fuentes de nitrógeno, I es aireación, J es agitación y K es microelementos.

Según la carta de Pareto (Figura 12), se observó que la aireación (I) fue el factor que presentó más significancia sobre el crecimiento de *A. brasilense* C16, con una magnitud positiva, por lo cual se debe evaluar en el valor de (2/5) en el siguiente diseño. La relación de aireación indicó que el nivel evaluado (2/5) para el volumen de medio de cultivo favoreció el crecimiento de la bacteria, debido a que esta relación disminuye la aireación aun más en comparación con el nivel (1/5) evaluado el cual está ubicado en el nivel bajo. Este resultado esta de acuerdo con lo reportado por Barak, R. *et al.*, (1982) donde señalan que a condiciones de baja concentración de oxígeno (microaerofilia) las células de *Azospirillum* sp. crecen y se multiplican satisfactoriamente, permitiéndoles expresar su actividad nitrogenasa. Para examinar los demás factores se partió de este fundamento de que si no se encuentra niveles adecuados de aireación para *A. brasilense* C16 en el medio, el oxígeno puede volverse una sustancia tóxica e inhibir su crecimiento debido a que este factor no actúa como nutriente por lo que para obtener su energía la bacteria la realiza a partir de reacciones que no impliquen su utilización (Comunicación directa Dr. Vera Lucia Baldani).

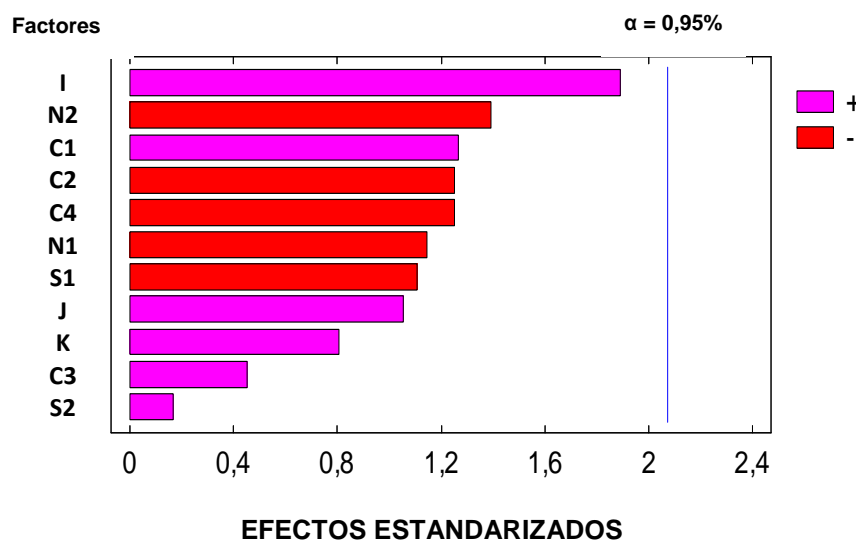


Figura 12. Diagrama de Pareto aplicando un Diseño Plackett-Burman para *A. brasilense* C16. Codificación de los factores: S1 y S2 sales, C1, C2, C3 y C4 fuentes de carbono, N1 y N2 fuentes de nitrógeno, I: aireación, J: agitación, K: microelementos.

La fuente de nitrógeno (N2), arrojó el segundo valor que presentó un efecto representativo sobre la variable respuesta en un nivel bajo, lo cual demuestra la importancia de este factor en bajas cantidades sobre el crecimiento de *A. brasilense* C16, si se mantiene una buena relación de C/N en el medio de cultivo, permitirá que el microorganismo exprese una óptima respuesta y a su vez promueva la síntesis de polisacáridos exocelulares provocando la formación de agregados celulares lo cual tiene un efecto positivo en la supervivencia y establecimiento en el suelo (Parra & Cuevas, 2001). Este factor fue sometido a un fuerte tratamiento para hidrolizar y liberar diferentes nutrientes como (proteínas, glúcidos, minerales entre otros). El anterior

resultado pudo favorecer la actividad enzimática y la viabilidad celular del microorganismo al aportar elementos nutricionales nitrogenados, fosfatos, potasio y diferentes vitaminas del complejo B (Dahm *et al.*, 1993; Rodelas *et al.*, 1993). Esto a su vez, pudo reflejarse al no presentar ningún efecto sobre el crecimiento del microorganismo la concentración de sal y la solución de microelementos evaluadas (Comunicación directa Dr. Vera Lucia Baldani).

Así mismo, la fuente de carbono (C1), presentó una influencia sobre el crecimiento de la bacteria con una magnitud positiva, por lo que se permite inferir que la relación de las cantidades utilizadas de nitrógeno y carbono en niveles bajos y altos en el diseño respectivamente, contribuye al óptimo desarrollo del microorganismo si se controla adecuadamente de manera que la limitación o el exceso de estos factores nutricionales pueden generar una respuesta desfavorable sobre la capacidad de fijación de Nitrógeno (Martínez *et al.*, 1984; Parra & Cuevas, 2001). Los resultados demuestran que en donde se utilizó la fuente de carbono (C1) posiblemente el microorganismo degradó otros compuestos presentes en ella y de mayor asimilación por la bacteria por ser una fuente de crecimiento y no un producto puro para análisis (P.A); contrario a lo reportado por Baldani, (1985) donde se afirma que esta especie no tiene la capacidad de metabolizar esta fuente de carbono.

La fuente de carbono (C2), a pesar de no presentar un efecto significativo sobre el crecimiento del microorganismo no se descartó por mantener una buena relación C/N que es un requisito importante en el balance nutricional del medio de cultivo. Igualmente, esta fuente de carbono además de aportar hidratos de carbono, le proporciona al medio de cultivo diferentes componentes tales como: minerales, cuerpos nitrogenados, ácidos libres, vitaminas entre otros; que favorecen de manera indirecta el crecimiento de *A. brasilense* C16. El utilizar este tipo de sustrato residual permite de forma viable contribuir con el sostenimiento de la agricultura al manejar elementos de bajo costo y de alto valor nutricional.

Además, se trabajaron como parámetros fijos los factores: fuente de carbono (C4), fuente de nitrógeno (N1) y la sal (S1) en los niveles bajos por encontrarse en el diagrama de Pareto (Figura 9) dentro de un nivel de significancia similar al de la fuente de carbono (C2). Esto con el fin de mantener la diversidad nutricional en el medio de cultivo.

La fuente de carbono (C4), se seleccionó debido a que *A. brasilense* C16 presenta alta actividad metabólica por este factor carbonado degradándolo para su rápida asimilación (Eckert, *et al.*, 2001). Además, dicha fuente manifiesta altos niveles de carbono por lo que constituye un elemento nutricional económico en comparación con la glucosa grado reactivo utilizada en el medio Dygs (Rodríguez Neto *et al.*, 1986).

La fuente de nitrógeno (N1), no fue omitida, debido a que se tuvo en cuenta como criterio de selección los altos niveles de porcentaje de nitrógeno y carbono orgánico presentes en esta fuente, su costo y el aporte nutricional que puede contribuir al óptimo desarrollo de *A. brasilense* C16. Además, presenta un valor de significancia estadística de (0,2649), que se encuentra en un rango de selección semejante a otros factores que fueron considerados y experimentalmente presentaron un comportamiento estable para la multiplicación de esta bacteria en el medio de cultivo. La respuesta mostrada por esta fuente nitrogenada permite inferir que el microorganismo pudo desdoblar polímeros de interés debido a que a esta fuente se le aplicó un tratamiento lo suficientemente eficaz lo que permitió hacer disponible nutrientes nitrogenados de un alto valor para el metabolismo de este microorganismo. Esta respuesta puede ser fundamentada en el hecho de que es una fuente de crecimiento más no un producto puro para análisis (P.A) por lo que en su composición se encuentran diferentes nutrientes de fácil asimilación por el microorganismo a pesar de que esta presente el almidón que es un compuesto de difícil degradación por la bacteria (Baldani J. *et al.*, 1979).

El factor sal (S1), no presentó efectos estadísticamente significativos, sin embargo al no estar presente este compuesto en el medio de cultivo conlleva a una disminución en los rendimientos producto/biomasa de *Azospirillum brasilense* (Martínez *et al.*, 2004). La concentración manejada en el diseño experimental representa un valor más bajo que el obtenido con el medio de referencia (Rodríguez Neto *et al.*, 1986). La importancia de este ión sobre la producción de poly-*b*-hidroxibutirato (PHB) en *Azospirillum brasilense*, utilizando bajas cantidades aumenta los rendimientos del microorganismo. Este resultado pueden estar relacionado con los que informan Schembri *et al.*, 1995 y Eberl *et al.*, 1996 con referencia a que los genes involucrados en la biosíntesis de PHB en *Acinetobacter* sp. se activan transcripcionalmente bajo limitación de fósforo o que bajo estas condiciones *Pseudomonas putida* convierte todo el carbono extracelular en materiales de reserva, respectivamente. De acuerdo a lo anterior se permite argumentar que *A. brasilense* C16 al igual que otras bacterias productoras de PHB, el fósforo tiene una marcada influencia sobre la producción del polímero a bajas concentraciones contribuyendo de esta forma a una óptima multiplicación de esta bacteria en el ambiente rizosférico, así mismo se debe moderar la concentración de potasio, debido a que este elemento mantiene la presión osmótica celular de bacterias del género *Azospirillum* sp. (Comunicación directa, Dra. Vera Baldani-Embrapa).

La relación N/P, influye notablemente sobre la producción y productividad de PHB, por lo que al mantener niveles bajos de fósforo, pero aumentando los de nitrógeno se alcanzan rendimientos mayores en bacterias del género *Azospirillum* sp. (Martínez *et al.*, 2004). Es por esta razón, que se mantuvieron los factores de nitrógeno y fósforo en cantidades proporcionales en el diseño experimental; a su vez la respuesta obtenida resultó similar para *A. brasilense* C16 por lo que se permite inferir que el fósforo es un elemento que regula la actividad metabólica de carbono y la fijación de nitrógeno del microorganismo, al participar como cofactor de numerosas reacciones metabólicas (Steenhoudt & Vanderleyden, 2000).

El factor agitación (J), no presentó un efecto estadísticamente significativo ($p < 0,05$), por lo tanto se decidió no tener en cuenta el nivel alto del mismo debido a que en trabajos realizados en Brasil sobre *Azospirillum* sp. por la Dra. Vera Lucía Baldani (Embrapa), esta bacteria microaerófila, fija nitrógeno bajo condiciones anaeróbicas por lo que altos regímenes de aireación tiene un efecto negativo sobre el crecimiento y la producción de biomasa en *Azospirillum* sp. (Martínez *et al.*, 2004). Es por esto, que si se manejaban altas revoluciones el microorganismo sería afectado y no tendría las condiciones de baja aireación para su multiplicación siendo este factor (I) el que presenta el mayor efecto sobre el crecimiento de esta bacteria, como lo indica la carta de Pareto (Figura 11); de acuerdo a lo anterior y al metabolismo de *A. brasilense* C16, se determinó fijar la agitación en el nivel medio a 120 rpm.

Para *A. brasilense* C16, se demostró que no era necesario la adición del factor sal (S2) en el medio de cultivo puesto que el valor estadístico fue de 0,8677 (Tabla 8) siendo muy superior a ($P < 0,05$), lo que indica que este factor no tiene ningún efecto sobre el crecimiento celular de esta bacteria. Esto se presentó muy posiblemente debido a que el microorganismo en el caso de la concentración de sal (S2) su efecto fue enmascarado por los demás sustratos empleados; siendo la fuente de carbono (C2) (fuente de crecimiento) la que presenta altos niveles de carbono (75%) y paralelamente otros elementos adicionales disponibles como: Mg, Na, K, Fe, Ca, Mn. De acuerdo a lo anterior, se puede inferir que al ser la fuente de carbono (C2) una de las fuentes nutricionales más rápidamente desdobladas por la actividad enzimática de *A. brasilense* C16 y ser a su vez fácilmente asimilable por esta bacteria permitió la liberación de los demás componentes impidiendo que el factor sal (S2) presentara una influencia clara sobre el crecimiento del microorganismo. Por lo tanto, se decidió descartarla debido a que la cantidad excedía lo establecido en el medio de cultivo y no era necesario agregarla puesto que el microorganismo se podía inhibir e influir de manera directa en su velocidad de crecimiento y multiplicación (Martínez & Viera, 1986).

Por otra parte la fuente de carbono (C3) se descartó por ser el segundo factor estadísticamente (0,655) menos influyente sobre el crecimiento del microorganismo, esto quizás se debió al hecho de que este sustrato no pudo ser metabolizado eficientemente por *A. brasilense* por presentar un esqueleto carbonado α -cetoglutarato- que para esta especie específicamente según reportes bibliográficos citados esta bacteria es incapaz de degradarlo (Baldani J. *et al.*, 1979) ó muy posiblemente se deba a que en el medio líquido se encontraban fuentes carbonadas más rápidamente degradadas por la diferentes enzimas de las rutas Entner-Doudoroff y Embden-Meyerhof-Parnas (Baldani J. *et al.*, 1979). Además este factor funciona paralelamente como fuente de nitrógeno (ión amonio) por lo que su respuesta sobre el crecimiento de *A. brasilense* C16 pudo estar influenciada por otras fuentes de crecimiento que a su vez presentaban iones amonio dentro de sus componentes.

La solución de microelementos (K) no se tuvo en cuenta, esta decisión se fundamentó en el hecho de que los elementos traza evaluados se presentaban en los demás sustratos

en cantidades similares por lo que dicha solución no tuvo una respuesta significativa sobre el crecimiento de *A. brasilense* C16 de esta manera se puede inferir que los constituyentes de esta solución experimentaron un proceso de precipitación en el medio de cultivo; por lo que debe tenerse en cuenta su manejo pues los umbrales de carencia y toxicidad particularmente para este microorganismo están muy próximos (Martínez & Viera, 1986). A pesar de este resultado cabe resaltar que la mayoría de los compuestos evaluados contribuyen a la estimulación del metabolismo del carbono tales es el caso del molibdeno que agregado en esta solución participa como un cofactor enzimático de la enzima nitrogenasa en la fijación de nitrógeno por este microorganismo (Comunicación directa Dr. Vera Lucia Baldani).

A partir de los análisis estadísticos del diseño Plackett-Burman se seleccionaron los tres factores más influyentes para ser evaluados en la etapa de optimización II. Además, fue necesario aplicar criterios adicionales para dilucidar la magnitud de los efectos y reducir (costos, disponibilidad) así el número de factores a evaluar en la siguiente etapa.

Se escogió el tratamiento N° 3, por presentar la mayor formación de biomasa en comparación con los demás tratamientos con un valor de 9,51 Log UFC/ml; además este tratamiento contenía los niveles (2/5) de aireación y el nivel alto de fuente de carbono (C1) y bajo fuente de nitrógeno (N2) que resultaron influyentes en el crecimiento de *A. brasilense* C16, de acuerdo con el análisis de varianza mostrado en la carta de Pareto para el diseño Plackett-Burman (Figura 12), razón por la cual la formulación final del medio como primer paso para continuar con el proceso de optimización fue la combinación obtenida en el tratamiento 3 (Tabla 10).

Tabla 10. Composición medio alternativo

SUSTRATO	g/L
Sal S1	0,01125
Fuente de Carbono C1	3
Fuente de Carbono C2	0,030375
Fuente de Carbono C4	0,0441
Fuente de Nitrógeno N1	0,032445
Fuente de Nitrógeno N2	0,848
Aireación I	2/5
Agitación J	120 rpm

4.2.2 Etapa de optimización (II)

Para plantear el diseño se tomó como base la formulación y las condiciones de operación del medio tres considerándolo como el punto central o nivel medio del diseño experimental.

El diseño designado por Box-Behnken consistió en la evaluación de todas las combinaciones posibles para los tres factores (aireación (I) **A**, fuente de nitrógeno (N2) **B** y fuente de carbono (C1) **C**) seleccionados del análisis anterior al presentar efectos significativos sobre la variable respuesta (Tabla 11).

Tabla 11. Factores influyentes analizados en la etapa de optimización, codificación de los factores para *A. brasilense* C16.

		NIVELES DEL FACTOR		
FACTOR	SÍMBOLO	BAJO (-1)	MEDIO (0)	ALTO (+1)
Aireación (J)	A	1/5	2/5	3/5
Fuente de Nitrógeno (N2)	B	0,424 g/L	0,848 g/L	1,272 g/L
Fuente de Carbono (C1)	C	1,5 g/L	3g/L	4,5 g/L

Los resultados de las lecturas del recuento en Log UFC/ml se presentan en la Tabla 12.

Se observó que los mejores tratamientos fueron en su orden el 12, 1, 3 y 5, los cuales mostraron una concentración promedio entre 9,30 Log 10 de UFC/ml, 9,15 Log 10 de UFC/ml, 9,15 Log 10 de UFC/ml y 9,15 Log 10 de UFC/ml con valores bajos de coeficiente de variación (CV) entre 0,41%, 0,68%, 0,33% y 0,56% entre las réplicas respectivamente. Los tratamientos 11, 4 y el 14 presentaron los menores valores promedio del recuento en Log UFC/ml entre 8,90 Log 10 de UFC/ml, 8,95 Log 10 de UFC/ml y 8,95 Log 10 de UFC/ml respectivamente.

Los resultados revelaron que no hubo diferencia significativa ($p < 0,05$) en las concentraciones del mejor tratamiento tanto en el Diseño Plackett-Burman como en la etapa de optimización aplicando el Diseño Box-Behnken.

Tabla 12. Número de células (Log UFC/ml) obtenidos del diseño experimental Box-Behnken para *A. brasilense* cepa C16.

DISEÑO BOX-BEHNKEN							
Tratamientos	Réplicas recuento			Media aritmética	Desviación estándar	Coeficiente de variación	Varianza
	1	2	3				
1	9,15	9,08	9,20	9,15	0,062522831	0,68%	0,0039091
2	9,11	9,15	9,08	9,11	0,033481663	0,36%	0,00112102
3	9,15	9,11	9,18	9,15	0,03108057	0,33%	0,000966
4	8,95	8,96	8,95	8,95	0,004825718	0,05%	2,3288E-05
5	9,11	9,20	9,11	9,15	0,052063502	0,56%	0,00271061
6	9,08	9,15	9,11	9,11	0,033481663	0,36%	0,00112102
7	9,00	8,95	9,04	9,00	0,043593301	0,48%	0,00190038
8	9,11	9,04	9,08	9,08	0,036285853	0,39%	0,00131666
9	8,95	9,04	9,00	9,00	0,043593301	0,48%	0,00190038
10	9,00	9,18	9,15	9,11	0,09421547	1,03%	0,00887655
11	8,90	8,90	8,91	8,90	0,005428999	0,06%	2,9474E-05
12	9,26	9,32	9,32	9,30	0,038651747	0,41%	0,00149396
13	9,04	9,11	9,08	9,08	0,036285853	0,39%	0,00131666
14	8,95	8,96	8,95	8,95	0,004825718	0,05%	2,3288E-05
15	9,11	9,04	9,18	9,11	0,067416204	0,74%	0,00454494

A partir de los datos obtenidos se aplicó un análisis estadístico utilizando el programa Statgraphics plus versión 5.1 para determinar el efecto de cada uno de los factores evaluados sobre la variable respuesta (Tabla 13).

En la tabla 13 se presenta el resultado arrojado por el software utilizado; en la columna N° 3 se encuentra el error estándar que mide la desviación del efecto analizado el cual estuvo alrededor del 1,19%. Por ejemplo, para la Aireación indica que los valores calculados para el modelo se alejan en promedio 0,4% de los datos experimentales. En general el valor del coeficiente de correlación del modelo generado es alto, lo que indica que el modelo explica el 60,10% de la variabilidad presentada en la experimentación, esto aumenta la confiabilidad del análisis realizado dando un valor aceptable para la descripción de procesos biológicos.

Tabla 13. Análisis de varianza (*Anova*) aplicando el Diseño Box-Behnken para *A. brasilense* C16. Codificación de los factores: A = aireación (I), B = fuente de nitrógeno (N2) y C = fuente de carbono (C1).

Factor	Suma de cuadrados	Error estándar	F-ratio	Estimación	P-valor
A = I	0,0045125	0,0045125	0,38	0,0475	0,5654
B = N2	0,0153125	0,01531	1,28	0,0875	0,3086
C = C1	0,0002	0,0002	0,02	0,01	0,902
AA	0,0136641	0,0136641	1,15	0,121667	0,3334
AB	0,0009	0,0009	0,08	0,03	0,7945
AC	0,013225	0,013225	1,11	0,115	0,3406
BB	0,0152026	0,0152026	1,27	-0,128333	0,3102
BC	0,015625	0,015625	1,31	0,125	0,3042
CC	0,00862564	0,00862564	0,72	0,0966667	0,4339
Error total	0,0596417	0,0119283			
Total (corr.)	0,149493				
$R^2 = 60,1041\%$ R^2 (ajustado para g.l) = 0,0 % Estadística Durbin-Watson = 3,06215 (P=0,0052) Autocorrelación residual Lag 1 = -0,558113					

El diagrama de Pareto (Figura 13) demuestra que ninguno de los factores evaluados fueron estadísticamente significativos, esto es un indicativo de que el medio de cultivo estandarizado no requiere ajuste adicional en su composición. Por otra parte se puede observar que la interacción entre los factores fuente de nitrógeno N2 (B) y fuente de carbono C1 (C) presentaron un efecto positivo sobre la variable de respuesta con una mayor significancia que los demás factores, de modo que existe influencia conjunta sobre el crecimiento de *Azospirillum brasilense* C16 indicando que el nivel adecuado de esta interacción en el medio de cultivo debe ser alto para no provocar una disminución en la respuesta. Simultáneamente, se examinó el efecto independiente de los factores dando como resultado que el factor fuente de carbono C1 (C), tiene el menor efecto individual por lo que debe existir una relación proporcional entre C/N en el medio de cultivo para que esta fuente (C) tenga un efecto óptimo sobre la variable de respuesta, mientras que el factor fuente de nitrógeno N2 (B) presentó un efecto individual representativo con una magnitud positiva.

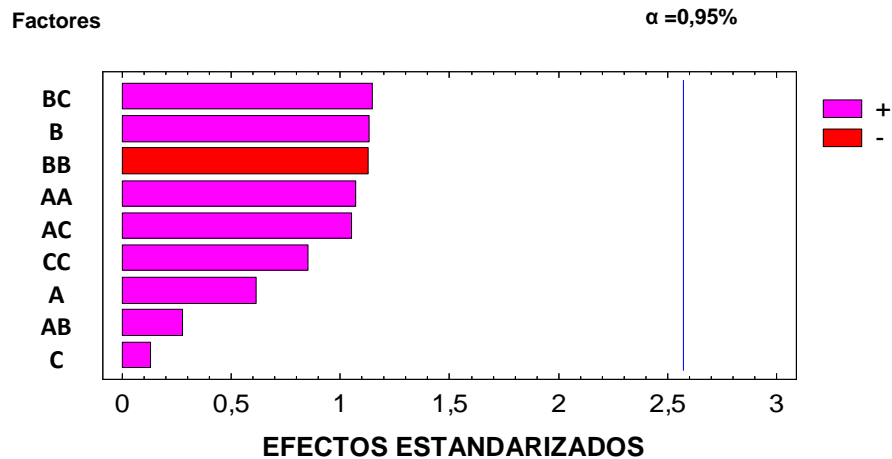


Figura 13. Diagrama de Pareto aplicando el Diseño Box-Behnken para *A. brasilense* C16. Codificación de los factores: **A: aireación (I)**, **B: fuente de nitrógeno (N2)** **C: fuente de carbono (C1)**.

El factor fuente de nitrógeno N2 denotado por la letra (B), presentó el mayor efecto sobre el crecimiento del microorganismo de forma cuadrática, individual, e interacción con los demás factores. Para el diseño del medio de cultivo alternativo se tuvo en cuenta el efecto individual y la interacción (concentración en el nivel alto) puesto que el efecto cuadrático no tiene un significado biológico.

El factor aireación I (A), presentó un efecto cuadrático representativo sobre la variable respuesta, pero no mostró un efecto significativo de forma individual.

En la figura 14 se observa que la interacción entre los factores presentó mayor significancia que los efectos individuales, a excepción de la interacción entre los factores A y B que no manifestaron una influencia sobre el crecimiento de *Azospirillum brasilense* C16.

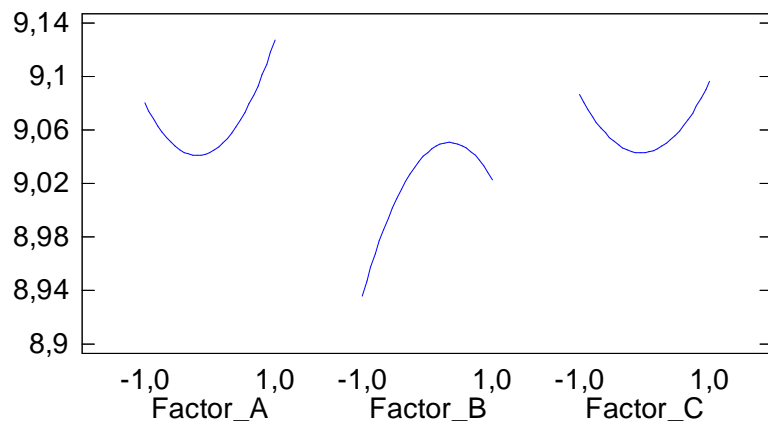


Figura 14. Comportamiento de los factores aplicando el diseño Box-Behnken para *A. brasilense* C16. Codificación de los factores: **A: aireación (I)**, **B: fuente de nitrógeno (N2)**, **C: fuente de carbono (C1)**.

En la (Figura 14) cuando el factor aireación I (A) y la fuente de carbono C1 (C), se encuentran en el nivel alto se presenta el mayor crecimiento celular de *A. brasilense* C16.

El factor aireación I (A) influyó el crecimiento de *A. brasilense* C16 al evaluarse de manera independiente con una magnitud positiva, indicando que el nivel adecuado de este factor en el medio de cultivo debe ser (3/5) para no provocar una disminución en la concentración de biomasa del microorganismo.

La fuente de nitrógeno N2 (B), cuando se encuentra en el nivel más alto presenta el mayor crecimiento de *A. brasilense* C16 (Figura 14).

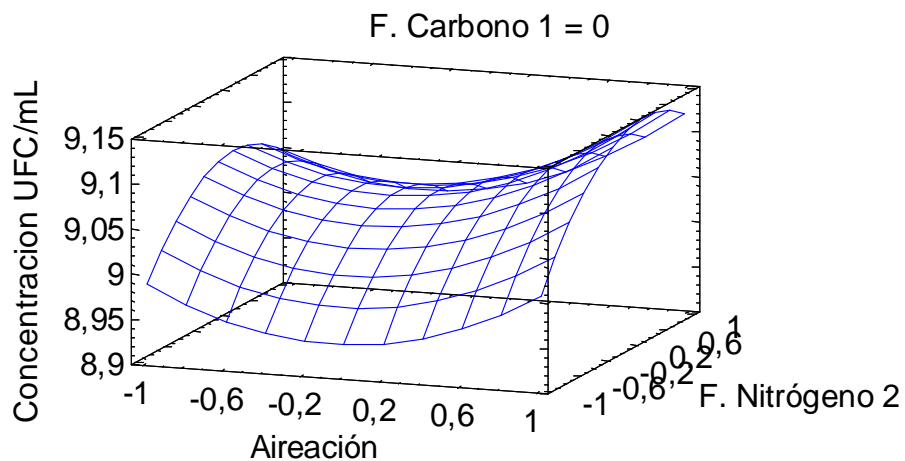


Figura 15. Superficie de respuesta de la interacción entre el factor aireación (A) y la fuente de nitrógeno 2 (B).

Los resultados obtenidos con los modelos de superficie de respuesta (Figura 15,16 y 17) mostraron los efectos relativos de dos variables cuando la concentración de la tercera variable se mantuvo en un nivel constante. Para el factor aireación (A) no se observa claramente una tendencia hacia los dos niveles evaluados (-1 y 1) debido a que se presenta similitud en la concentración del microorganismo; mientras que se observa una menor curvatura en los puntos centrales por lo que nos permite inferir una baja tasa de multiplicación de la bacteria en estas magnitudes (Figura 15). Así mismo, para la fuente de nitrógeno 2 (B), las máximas productividades se obtuvieron cuando esta variable se encontró en el nivel 1 manteniendo constante la fuente de carbono 1 (C).

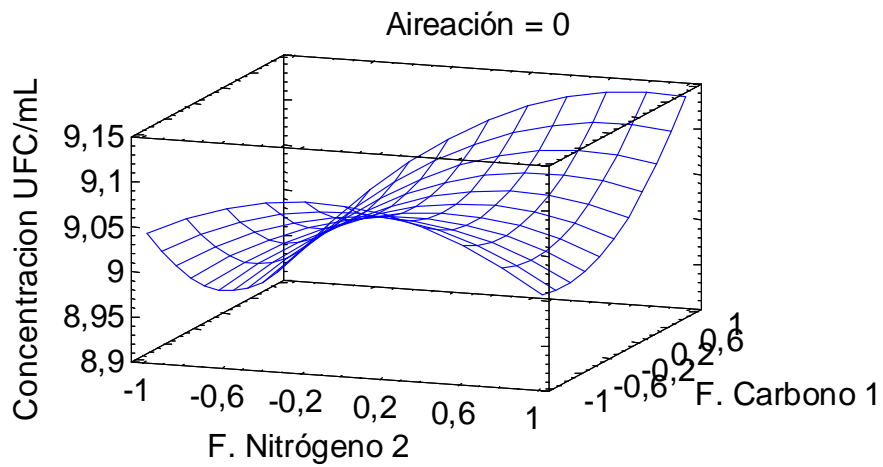


Figura 16. Superficie de respuesta de la interacción entre la fuente de nitrógeno 2 (B) y la fuente de carbono 1 (C).

Cuando la magnitud de aireación (A) se mantuvo constante, se observa que el factor fuente de nitrógeno 2 (B) presentó una tendencia hacia los puntos centrales con una mayor curvatura en la gráfica, lo que confirma que la formulación de esta cantidad en el nivel medio es la más apropiada para el crecimiento de *Azospirillum brasilense* C16. La respuesta del factor fuente de carbono 1(C), reflejó un máximo crecimiento del microorganismo en la región del espacio explorada cuando este factor está en un nivel 1 (Gráfica 16).

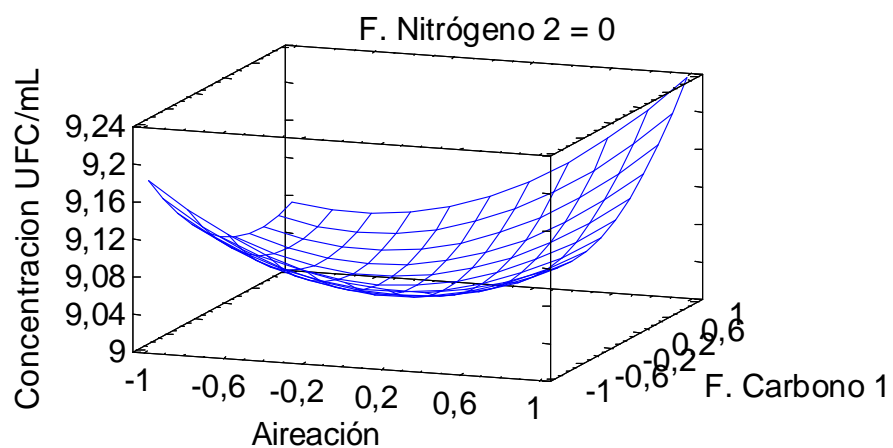


Figura 17. Superficie de respuesta de la interacción entre el factor aireación (A) y fuente de carbono 1 (C).

En el modelo de superficies de respuesta (Figura 17) generado por el programa Statgraphics plus versión 5.1; cuando el factor fuente de nitrógeno 2 (B) se mantuvo constante, fue observado el efecto de los niveles evaluados para el factor aireación (A) sobre la variable respuesta. Cuando los valores de este factor se van acercando a los niveles bajos hasta situarse en el nivel de -1 se presentó una tendencia positiva sobre el crecimiento del microorganismo. A su vez, la fuente de carbono 1 (C), mostró una tendencia a maximizar la respuesta si se utiliza un nivel de 1.

El análisis estadístico dió como resultado los coeficientes de regresión generados y se reemplazaron en la ecuación 3 del modelo de regresión.

$$Y = 9,04333 + 0,02375A + 0,04375B + 0,005C + 0,0608333A^2 + 0,015AB + 0,0575AC - 0,0641667B^2 + 0,0625BC + 0,0483333C^2$$

El análisis de varianza de la ecuación de regresión cuadrática demuestra la significancia del modelo, es decir que los datos arrojados en el test de Fischer-F y en el coeficiente de correlación ($R^2 = 0,601$) aportan resultados significativos.

Esta ecuación tiene la ventaja de mostrar el efecto de cada factor independiente de su nivel. De acuerdo con esta, la aireación (A) tiene un efecto lineal positivo sobre la concentración del microorganismo, al igual que la fuente de nitrógeno 2 (B) y la fuente de carbono 1(C). Así mismo, el efecto cuadrático del factor fuente de nitrógeno 2 (B) presentó el mayor efecto sobre el crecimiento de *Azospirillum brasilense* C16.

Los resultados de los análisis de los diseños experimentales obtenidos en estudio fueron similares a los encontrados por Plazas C. (2007), al manejar diseños estadísticos como el Plackett-Burman y el Box-Behnken los cuales arrojaron óptimos resultados en el aumento de la concentración de biomasa de 2 Log 10 UFC/ml en un tiempo de fermentación de 22 horas para la bacteria fosfato solubilizadora *Enterobacter agglomerans* utilizando materias primas de bajo costo y de esta manera se obtuvo un medio de cultivo alternativo más económico que favorece la multiplicación de esta bacteria comparado con el medio convencional (SRSM).

4.3 MEDIO ALTERNATIVO

La curva muestra detalladamente los valores obtenidos en la fermentación en un tiempo de 60 horas, a 120 rpm con una temperatura de $30 \pm 2^\circ\text{C}$, se observa un incremento de tres exponentes respecto a la concentración inicial en el medio de cultivo optimizado.

La curva de crecimiento de *Azospirillum brasilense* C16 para el medio de cultivo alternativo optimizado inició en 8,7 Log UFC/mL, presentando un crecimiento óptimo hasta las 24 horas con un valor de 10,9 Log UFC/mL, seguido de una fase de descenso entre la hora 27 y 33, y a si mismo presentando una fase estacionaria de la hora 36 a la 45 para finalmente alcanzar la fase de muerte donde disminuyó la viabilidad del microorganismo (Figura 18).

Estos resultados son similares a los reportados por Reyes *et al.*, (2006) quienes utilizaron fuentes nutricionales alternativas de bajo costo y fácil disponibilidad en la región como la melaza, urea y harina de hueso para satisfacer los requerimientos nutricionales de bacterias del género *Azospirillum* sp. observando un crecimiento en el orden de 9,8 – 10 log UFC/mL entre un tiempo de 24 y 28 horas de fermentación manteniendo una baja aireación de 0,3 mg/L (OD).

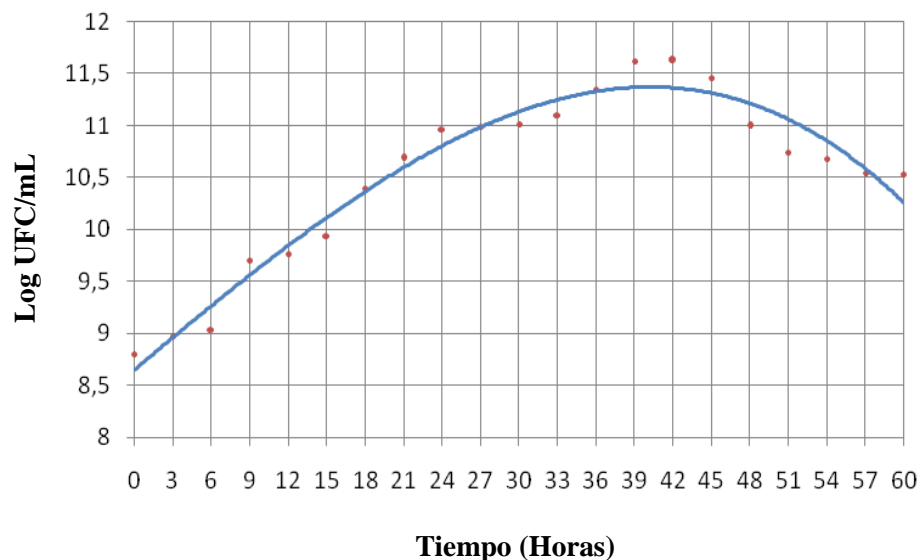


Figura 18. Cinética de crecimiento para *A. brasilense* C16 en función del tiempo en el medio de cultivo optimizado.

Se linealizó la curva de crecimiento en el medio optimizado aplicando el método de mínimos cuadrados para obtener la recta de regresión desde la hora 0 hasta la hora 30 (ver Figura 19) para hallar la velocidad específica de crecimiento y el tiempo de duplicación debido a que en este intervalo de tiempo finaliza la fase exponencial y se presenta el mayor valor del estadístico R^2 .

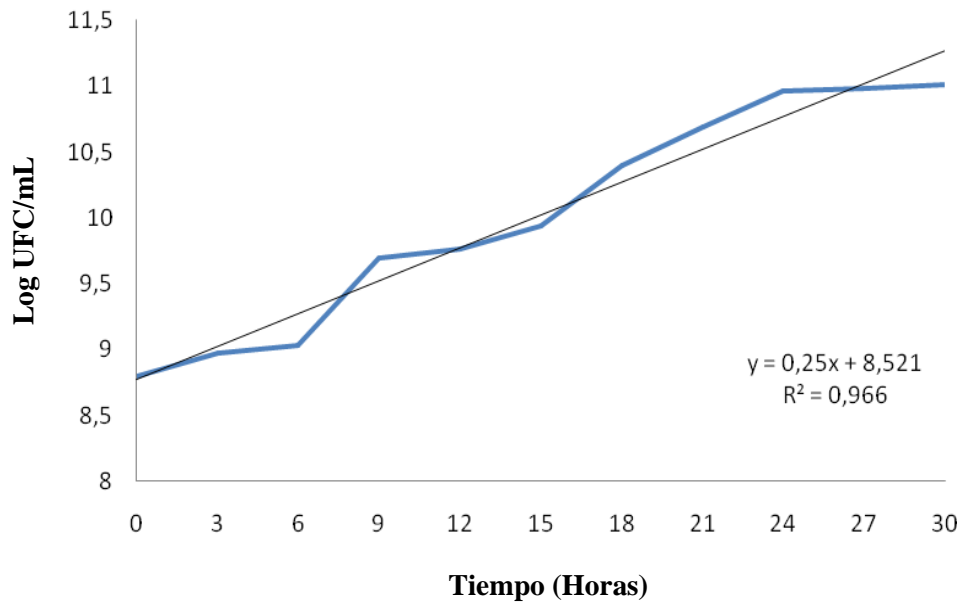


Figura 19. Linealización de la curva de crecimiento para *A. brasilense* C16 en el medio de cultivo optimizado.

La ecuación de regresión obtenida fue:

$$y = 0,25x + 8,521; R^2 = 0,966$$

Con un $p < 0,01$ existe una relación estadísticamente significativa entre las variables. El valor de coeficiente de correlación R^2 , indica que el modelo explica el 96,6% de variabilidad de la variable dependiente, por lo que aumenta la confiabilidad del análisis realizado. Así mismo, se puede asegurar que la cinética es de orden 1, por lo que el microorganismo responde a una cinética de tipo exponencial.

El resultado de la velocidad específica de crecimiento para *A. brasilense* C16 en el medio optimizado fue de $\mu_x = 0.25 \text{ h}^{-1}$, para alcanzar una concentración máxima de células de 10,9 Log UFC/mL al final del proceso de multiplicación. Y el tiempo necesario para que la población de *Azospirillum brasilense* C16 se duplique fue de 2,77 horas.

Las curvas de crecimiento para ambos medios de cultivo evaluados iniciaron en 8 log UFC/ml presentando una fase exponencial continua que comprendió un tiempo de 30 horas (Figura 21).

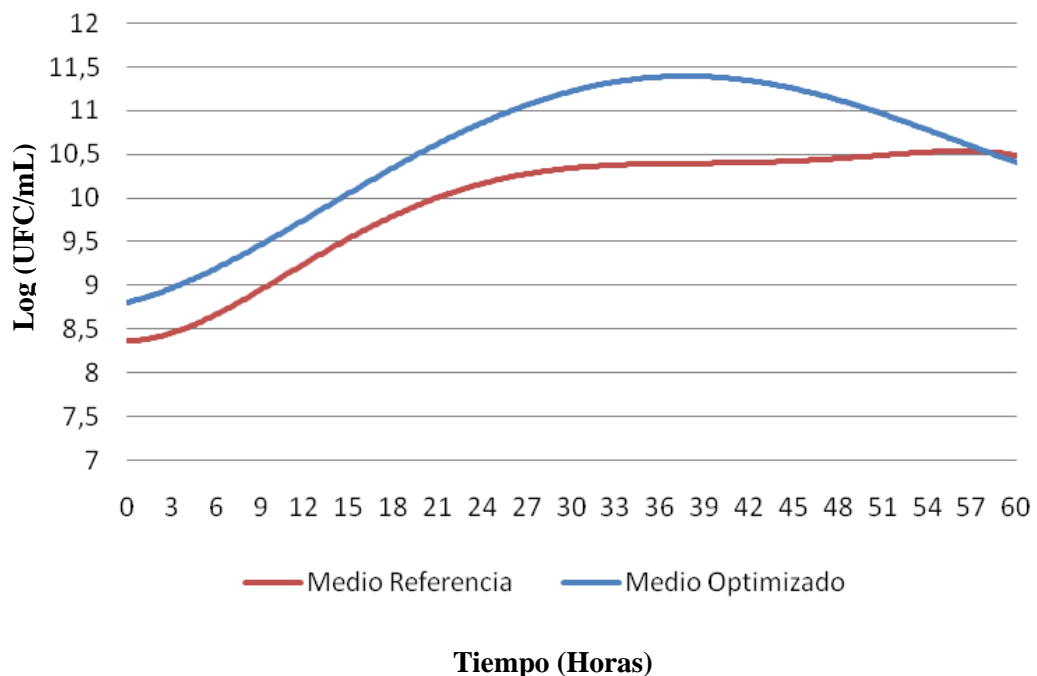


Figura 21. Cinética de crecimiento para *A. brasilense* C16 en función del tiempo en el medio de referencia y en el medio optimizado.

Como se visualiza en la (Figura 22), el microorganismo en estudio alteró el pH de los medios de cultivo evaluados durante el proceso de fermentación como resultado de las sustancias producidas por su metabolismo desencadenando una reacción en la medida que se consumen los sustratos. Para el medio de cultivo convencional, se observó un aumento progresivo del pH en toda la cinética de *A. brasilense* C16 hasta alcanzar un pH básico mayor a 8 en la fase exponencial de crecimiento debido a que el microorganismo degrada rápidamente los sustratos presentes en este medio por lo que

llega a una etapa donde agota sus fuentes nutricionales y se detiene su crecimiento hasta alcanzar la fase de muerte celular en corto tiempo. Mientras que para el medio mejorado se presentó un aumento leve del pH manteniéndose en la neutralidad, presentando un pH de 7,5 en la fase exponencial de crecimiento durante el proceso de fermentación, lo que permite inferir que el crecimiento del microorganismo puede ser garantizado debido a que esta bacteria crece a pH cercanos a la neutralidad (Döbereiner J., 1983).

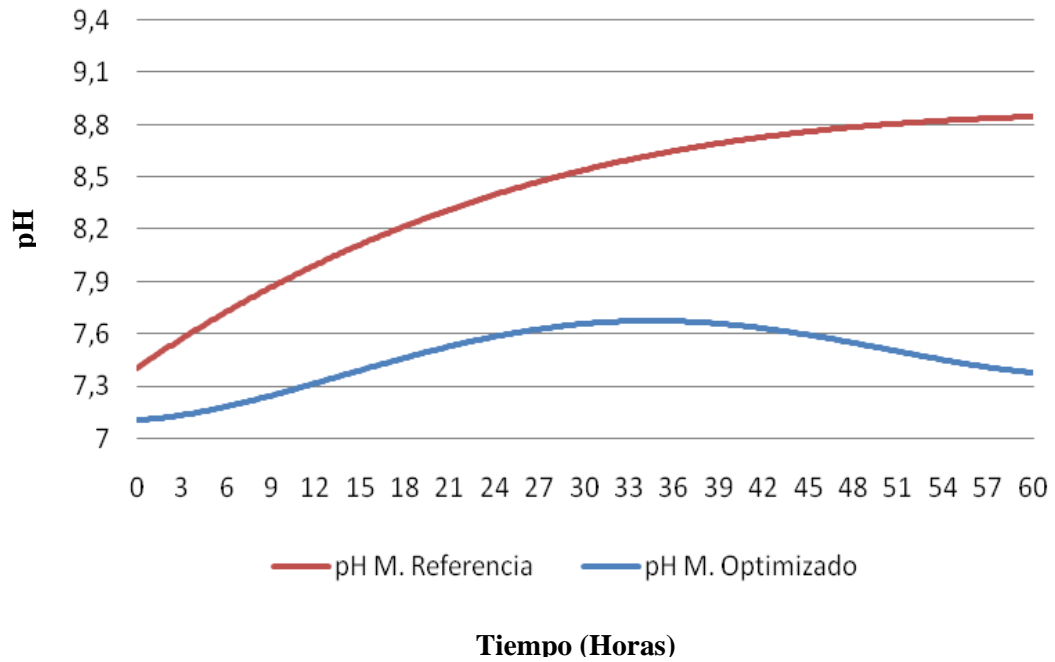


Figura 22. Comportamiento del pH en el medio de cultivo de referencia y en el medio de cultivo optimizado

4.4 MODELO ECONÓMICO DE LOS MEDIOS DE CULTIVO

El análisis costo-beneficio realizado a la tecnología generada arrojó los siguientes resultados:

El costo por litro en el medio Dygs es de \$ **2922,76** pesos utilizando sustratos grado reactivo ver tabla 14, mientras que para el medio optimizado empleando fuentes nutricionales alternativas según la tabla 15 el costo por litro es de \$ **85,43** pesos.

Lo anterior es muy significativo debido a que en un futuro se puede estandarizar y masificar esta tecnología a los agricultores.

Tabla 14. Costos Medio tradicional Dygs

SUSTRATO	CANTIDAD	VALOR	CANTIDAD UTILIZADA (g/L)	TOTAL
K_2HPO_4	500g	\$ 120000	0,5 g/L	\$ 120
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	1000g	\$ 200000	0,5 g/L	\$ 100
Glucosa	1000g	\$ 145000	2 g/L	\$ 290
Peptona Universal	500g	\$ 307400	1,5 g/L	\$ 922,2
Extracto de levadura	500g	\$ 150000	2 g/L	\$ 600
Ácido glutámico	250g	\$ 331760	1,5 g/L	\$ 190,56
Ácido málico	500g	\$175000	2 g/L	\$ 700
TOTAL		\$ 1'429.160	10 g/L	\$ 2922,76

Tabla 15. Medio Alternativo optimizado

SUSTRATOS ALTERNATIVOS	CANTIDAD	VALOR	CANTIDAD UTILIZADA (g/L)	TOTAL
Sal 1	500 g	\$ 4500	0,25 g/L	\$ 2,25
Fuente de Carbono 1	1000 g	\$ 1500	4,5 g/L	\$ 6,75
Fuente de Carbono 2	500 ml	\$ 3000	6,75 ml/L	\$ 40,5
Fuente de Carbono 4	500 ml	\$ 4000	0,77 ml/L	\$ 6,16
Fuente de Nitrógeno 1	1000 ml	\$ 1500	14,42 ml/L	\$ 21,63
Fuente de Nitrógeno 2	500 g	\$ 3200	1,272 g/L	\$ 8,14
	TOTAL	\$ 17.700	8,216 g/L	\$ 85,43

5. CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos en la presente investigación nos permiten concluir:

La aplicación de herramientas estadísticas y de diseños de experimentos demostraron ser estrategias útiles y eficientes para llevar a cabo la optimización de medios de cultivo. El análisis demostró que la producción de biomasa en *A. brasilense* C16 esta determinada por los siguientes factores: aireación I (A), fuente de nitrógeno N2 (B) y fuente de carbono C1 (C).

El diseño de Box-Behnken demostró que para mantener una adecuada concentración de *Azospirillum brasilense* C16, es preciso que el balance de las magnitudes de los factores sean cuidadosamente controladas manteniendo estables la relación de aireación y agitación.

El medio alternativo propuesto, presentó una concentración de biomasa del orden de 1×10^{10} UFC/ml, en un tiempo óptimo de fermentación de 24 horas, al igual que el medio de referencia pero utilizando fuentes de crecimiento de menor costo.

El medio de cultivo alternativo para *Azospirillum brasilense* C16 mostró una economía del 95% en comparación con el medio de referencia.

La disminución de los costos al reemplazar insumos grado reactivo en el medio convencional por fuentes nutricionales alternativas fue de \$ **85,43** pesos por litro para mantener un óptimo crecimiento del microorganismo, mientras que el costo normal de este medio de referencia tiene un precio estimado de \$ **2922,76** pesos por litro.

6. CONSIDERACIONES

Llevar a cabo un proceso de fermentación a escala piloto para un volumen (20 y 50 L) con el medio de cultivo optimizado controlando factores de aireación y agitación para este microorganismo.

Efectuar la estabilidad del medio optimizado vs el medio convencional a través del tiempo.

Realizar un estudio sobre el metabolismo y bioquímica de las cepas de *Azospirillum* sp. del Banco de cepas del Laboratorio de Microbiología de suelos, para entender los requerimientos fundamentales del microorganismo y aprovechar el potencial de estas bacterias como fijadoras de nitrógeno y promotoras de crecimiento vegetal.

Evaluar las diferentes cepas de *Azospirillum* sp., aisladas de cultivos de pasto Guinea (*Panicum máximum* Jacq) en el medio de cultivo alternativo para determinar su comportamiento y así poderlas implementar en cultivos de interés agrícola.

BIBLIOGRAFÍA

ALVAREZ MORALES, R. A. & A. LEMOS PASTRANA. Chemotaxis of *Azospirillum lipoferum* and *Azospirillum brasilense* toward root exudates of Gramineae, 1980. Rev. Lat-amer. Microbiol 22: p. 131-136.

BACA, B.; SOTO, L. & PARDO, M. Fijación biológica de nitrógeno, 2000. Elementos. 38: p. 39-49.

BASHAN, Y. Interactions of *Azospirillum* spp. in soils, 1999. Review. Biol Fertil Soils 29: p. 246-256.

BASHAN, Y. & VAZQUEZ, P. Effect of calcium carbonate, sand and organic matter levels on mortality of five species of *Azospirillum* in natural and artificial bulk soils, 2000. Biol Fertil soils 30: p. 450-459. Disponible en: <http://www.bashanfoundation.org/gmaweb/pdfs/ronaldpgpb8.pdf>

BALDANI, JOSÉ IVO *et al.*, Genus *Azospirillum* sp., 1979.

BALDANI, V.; BALDANI, J. & DÖBEREINER, J. Effects of *Azospirillum* inoculation on root infection and nitrogen incorporation in wheat, 1983. Can. J. Microbiol. 29: p. 924-929.

BARAK, R.; I. NUR. & Y. OKON. Detection of chemotaxis in *Azospirillum brasilense*, 1983. J. Appl. Bacteriol. 53: p. 399-403.

BARAK, R. *et al.*, Aerotactic response of *Azospirillum brasilense*, 1982. J. Bacteriol. 152: p. 643-649.

BLEAKLEY, B.H. *et al.*, Floc formation by *Azospirillum lipoferum* grown on poly-hydroxybutyrate, 1988. Appl. Environ. Microbiol. 54: p. 2986-2995.

BONILLA, R. *et al.*, Generación de tecnología para la utilización de la fijación no simbiótica de nitrógeno como alternativa a la fertilización. Boletín de Investigación. Bogotá D.C: Produmedios, 2000.

BORREGO, S. *et al.*, Optimización de un medio de cultivo salino para la producción de androstendiona a partir de colesterol usando la cepa *Mycobacterium* sp. MB-3683. En Revista CENIC. Ciencias Biológicas, la Habana, Cuba 2004. Disponible en: <http://elfosscentiaae.cigb.edu.cu/PDFs/BA/2004L.pdf>.

BOTHE, H. *et al.*, Transformations of inorganic nitrogen by *Azospirillum* spp., 1981. Arch. Microbiol., Vol 130. p. 96-100.

BROCK, T.D.; SMITH, D. & MADIGAN, Michael. Microbiología. México D.F, 1982. 4 ed.: Prentice hispanoamericana.

CABALLERO MELLADO, JESÚS. El género *Azospirillum* sp., 2002. Disponible en: <http://biblioweb.dgsca.unam.mx/libros/microbios/Cap10/imagenes/c10im2.html>.

CÁRDENAS, DIANA. Aislamiento y caracterización de cepas de *Azospirillum* sp. con potencial biofertilizante en pasto guinea (*Panicum maximum* jacq) del valle del Cesar, 2007. Tesis de Maestría Universidad Militar Nueva Granada.

CELIS, R. & W. C. Koskinen. Un enfoque integrado para el manejo biológico de los suelos. Cuba, 2001. XV Congreso Latinoamericano de la ciencia del suelo.

DAHM, H. *et al.*, Production of B-group vitamins by *Azospirillum* spp. grown in media of different pH at different temperatures, 1993. Z. Mikrobiol. 148: p. 195-203.

DALLA S. *et al.*, Effects of inoculation of *Azospirillum* sp. in maize seeds under field conditions, 2004. Food, Agriculture and Environment, 2(1): p. 238-242.

DANTE, R.C *et al.*, Fraccional factorial design of experiments for PEM fuel cell performances improvement, 2003. International Journal of Hydrogen Energy. 28: p. 343-348.

DÍAZ A. & COTES A. Optimización de un medio de cultivo para la producción de la levadura *Pichia onychis* (Lv027). Revista Colombiana de Biotecnología, 2005. Vol VII N° 1. p. 51-58.

DOBBELAERE, S. *et al.*, Responses of agronomically important crops to inoculation with *Azospirillum* sp., 2001. Aust. J. Plant Physiol, 28: p. 871-879.

DÖBEREINER J. *Ten years of Azospirillum*, 1983. p. 9-23. In: Klingmüller, W. (ed.), *Azospirillum* II: Genetics, physiology, and ecology.

DÖBEREINER J. *et al.*, Como isolar e identificar bacterias diazotróficas de plantas ñao-leguminosas. Embrapa-SPI, Brasília, 1995. p. 60

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

EBERL, L. *et al.*, Physiological responses of *Pseudomonas putida* KT2442 phosphate starvation, 1996. Microbiology 142: p. 155-163.

ECKERT, B. *et al.*, *Azospirillum doebereineriae* sp. nov., a nitrogen-fixing bacterium associated with the C4-grass *Miscanthus*, 2001. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 51: p. 17-26.

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

FERNÁNDEZ, C. & R. NOVO. Fijación biológica de nitrógeno, Capítulo I Vida microbiana del suelo. Cuba, 1988. Ed.: André Voisan.

FERRÉ, JOAN. El diseño factorial completo 2k. Grupo de Quimiometría y Cualimetría. Departamento de Química Analítica y Química Orgánica. Universidad Rovira i Virgili (Tarragona), 2002. Disponible en: <http://www.quimica.urv.es/quimio>.

FREITAS, A. D. S. & STAMFORD, N. P. Associative nitrogen fixation and growth of maize in a Brazilian rainforest soil as affected by *Azospirillum* and organic materials, 2002. Tropical Grasslands, 36 p. 77-82.

GARRIDO, M. Aislamiento e identificación de bacterias diazotróficas de suelos del valle y sabana del cesar, 2007. Tesis de Maestría Universidad Militar Nueva Granada.

HAALAND, PD. Experimental design in biotechnology. New York USA, 1989. Vol 105. ASQC quality press. Ed. Marcel Dekker. p. 1,3 y 8.

HARTMANN, A.; H. FU, & R. H. BURRIS. Influence of amino acids on nitrogen fixation ability and growth of *Azospirillum* spp., 1988. Appl. Environ. Microbiol. 54: p. 87-93.

HOLT, J. Azotobacteraceae. In: Bergey's of systematic bacteriology. Baltimore : Williams and Wilkins, 1984. Vol. 1. p. 220-229.

HUERGO, L. Regulação do metabolismo de nitrogênio em *Azospirillum brasilense*. Curitiba, Brasil 2006. Tesis de doctorado. Doctor en Ciencias y Bioquímica. Universidade federal do Paraná.

ICA. Normas del ICA en materia de insumos agrícolas. Artículo 1 y 29. Bogotá D.C. 1999.

ICA. Resolución No. 00150: por la cual se adopta el Reglamento Técnico de Fertilizantes y Acondicionadores de Suelos para Colombia. Bogotá D.C. 2003.

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

LARIA, G. *et al.*, Fijador de Nitrógeno. *Azospirillum* sp. San Salvador, 2003.

LIENGEN, T. Conversion factor between acetylene reduction and nitrogen fixation in free-living cianobacteria from high arctic hábitats, 1999. Canadian Journal of Microbiology. p. 223-229.

LÓPEZ DE VICTORIA, G. & C. R. LOVELL. Chemotactic behavior of *Azospirillum* species to aromatic compounds, 1993. Appl. Environ. Microbiol. 59: p. 2951- 2955.

LUGTENBERG, B.; THOMAS F, A. & WOENG. Microbe-plant interactions: principles and mechanisms, 2002. Anton van Leewenhoek 81: p. 373-383.

MALIK, K. A. & H. G. SCHLEGEL. Chemolithoautotrophic growth of bacteria able to grow under N₂-fixing conditions, 1981. FEMS Microbiol. Lett. 11: p. 63-67.

MARÍN, *et al.*, Fixação biológica de nitrogênio: bactérias fixadoras de nitrogênio de importância para a agricultura tropical, 1999. Disponible en: <http://www.cnpab.embrapa.br>

MARTÍNEZ DRETS, G. *et al.*, Catabolism of carbohydrates and organics acids and expression of nitrogenase by *Azospirilla*, 1984. Appl. Environ. Microbiol. 159: p. 80-85.

MARTÍNEZ JORGE, *et al.*, Producción de polihidroxicanoatos en bacterias diazótroficas y la influencia de la aireación en la síntesis de poli-β-hidroxibutirato en cepas de *Azospirillum brasilense*. Facultad de Biología Universidad de la habana, 2004. Disponible en: <http://www.dict.uh.cu/Revistas/Bio%202004/Bi18104-10.pdf>

MARTÍNEZ J. L. & VIERA. C. Metabolismo secundario en *Azospirillum* brasilense, 1986. Disponible en: <http://www.buap.mx/investigacion/icuap/area.htm>

MAYEA, S. Microbiología Agropecuaria. La Habana: Félix Valera, 1998. V.2, p. 156-178.

MONTGOMERY, D. Diseño y Análisis de Experimentos, 1991. Iberoamerica p. 334-335 y 490-491.

NOVO, R. Microbiología y Química de suelos. La Habana. Cuba: Pueblo y Educación, 1993. p. 1-61.

OELZE, J. & G. KLEIN. Control of nitrogen fixation by oxygen in purple nonsulfur bacteria, 1996. Arch. Microbiol 165: p. 219-225.

OKON, Y. & R. ITZIGSOHN. Poly- β -hydroxybutyrate metabolism in *Azospirillum brasilense* and the ecological role of PHB in the rhizosphere, 1992. FEMS Microbiol. Rev. 103: p. 131-140.

OKON, Y., S. L. ALBRECHT, & R. H. BURRIS. Carbon and ammonia metabolism of *Spirillum lipoferum*, 1976. J. Bacteriol. 128: p. 592-597.

PARRA, Y. & CUEVAS, F. Potencialidades de *Azospirillum* como inoculante para la agricultura, 2001. Cultivos Tropicales, 23: p. 31-41.

PEOPLES, M. & CRASWELL, E. Biological nitrogen fixation; investments expectations and actual contributions to agriculture, 1992. Plant and Soil. 141: p. 13 – 39.

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

PLAZAS, C. Mejoramiento de un medio de cultivo para la producción de un inoculante con base en bacterias fosfato solubilizadoras, 2007. Tesis de Grado. Microbiología Industrial. Pontificia Universidad Javeriana.

REINHOLD, B.; T. HUREK & I. FENDRIK. Strain-specific chemotaxis of *Azospirillum* spp., 1985. J. Bacteriol. 162: p. 190-195.

REYES, J.; CONTRERAS, B. & LÓPEZ S. Obtención de microorganismos nativos con potencial biofertilizante para su aplicación en los cultivos del invernadero “Flores Iscalá” de la Universidad Francisco de Paula Santander, 2006. Tesis de Grado. Ingeniería de producción Biotecnológica. Universidad Francisco de Paula Santander.

RODELAS, B. *et al.*, Production of vitamins by *Azospirillum brasilense* in chemically-defined media, 1993. Plant. Soil. 153: p. 97-101.

RODRÍGUEZ-CÁCERES, E. A. Improved medium for isolation of *Azospirillum* spp., 1982. Applied and Environmental Microbiology, 44: p. 990-991.

ROLDÁN *et al.*, Incrementos de la fijación biológica del nitrógeno mediante la inoculación combinada de las bacterias fijadoras de nitrógeno atmosférico, 2003. Disponible en: <http://www.monografias.com/trabajos12/fibi/fibi2.shtml>.

SADASIVAN, L. & C. A. NEYRA. Flocculation in *Azospirillum brasilense* and *Azospirillum lipoferum*: exopolysaccharides and cyst formation, 1985. J. Bacteriol. 163: p. 716-723.

SÁNCHEZ, M. Microbiología Agrícola. Serie de apuntes N°3. Chapingo, México: s.n., 1964. p. 568.

SCHEMBRI, M.A. *et al.*, Identification of a 13-kDa protein associated with the polyhydroxyalcanoic acid granules from *Acinetobacter* spp, 1995. Fems Microbiol. Lett 133. p. 277-283.

SCHMIDT, E. L. Initiation of plant root microbe interactions, 1979. Ann. Rev. Microbiol. 33: p. 355-376

SPRENT, J. & SPRENT, P. Nitrogen fixing organisms. Chapman and Hall, 2 ed., London – England, 1990. p. 256.

STEENHOUDT, O., & J. VANDERLEYDEN. Azospirillum, a free-living nitrogen-fixing bacterium closely associated with grasses: Genetic, biochemical and ecological aspects, 2000. FEMS Microbiol. Rev., Vol. 24, p. 487–506

TAL, S. & Y. OKON. Production of the reserve material poly-b-hydroxybutyrate and its function in *Azospirillum brasilense*, 1985. Cd. Can. J. Microbiol. 31: p. 608-613.

TILAK, K. V.; K. SCHNEIDER & H. G. SCHLEGEL. Autotrophic growth of nitrogen-fixing *Azospirillum* species and partial characterization of hydrogenase from strain CC. Curr, 1986. Microbiol. 13: p. 291-297.

TORRES T. & YEPES M. Evaluación de medios de cultivos líquidos y dos sistemas de separación físicos para dos bacterias del género *Azotobacter* sp. a nivel laboratorio, 2007. Tesis de Grado. Fundación Universidad de América. Ingeniería Química.

VIEIRA J. & DIÓGENES CUBERO. XI Congreso Nacional Agronómico-III Congreso Nacional de suelos. “Abonos orgánicos y fertilizantes químicos”. Bogotá, 1999.

WESTBY, C. A.; D. S. CUTSHALL & G. V. VIGIL. Metabolism of various carbon sources by *Azospirillum brasilense*, 1983. J. Bacteriol. 156: p. 1369-1372.

ANEXOS

Anexo A. Medio de cultivo para obtención de Biomasa

Medio de Referencia Dygs (Rodríguez Neto *et al.*, 1986),

Componentes	Cantidad (g/L)
K ₂ HPO ₄ * 3H ₂ O :	0,5 g/L
MgSO ₄ *7H ₂ O :	0,5 g/L
Glucosa :	2g/L
Peptona Universal :	1,5 g/L
Extracto de levadura :	2g/L
Ácido glutámico :	1,5 g/L
Ácido málico :	2g/L

pH final ajustado para 6,8.

Anexo B. Medios de cultivo para identificación

Medio Batata (*Azospirillum* sp.)

Componentes	Cantidad (g/L)
Papa :	200 g/L
Ácido málico :	2,5 g/L
Sacarosa :	2,5 g/L
Sol. Micronutrientes :	2 mL
Sol. Vitaminas:	1 mL

Pesar 200 g de papa, pelar, lavar y hervir durante 30 minutos. En seguida, filtrar en gasa y algodón. Mezclar las cantidades de ácido málico y sacarosa disolviendo en agua destilada, hasta 50 mL y ajustar el pH a 6,5-7,0 con KOH. Adicionar el filtrado de esa

solución y las soluciones de micronutrientes y vitaminas. Completar el volumen para 1000 mL con agua destilada.

Agar Rojo Congo (Rodríguez-Cáceres, 1982)

Componentes	Cantidad (g/L)
K ₂ HPO ₄	0.5 g/L
MgSO ₄ .7H ₂	0, 0.2 g/L
NaCl	0.1 g/L
Extracto de levadura	0.5 g/L
FeCl ₃ .6H ₂ O	0,015 g/L
Ácido málico	5,00 g/L
KOH	4.8 g/L
Agar	20 g/L

El pH se ajusta a 7.0 con 0,1 N KOH, y el medio se autoclava. Luego se adicionan 15 mL de una solución acuosa 1:400 de Rojo Congo (autoclavado separadamente).

Anexo C. Medio de cultivo optimizado para la cepa C16

Componentes	Cantidad (g/L)
Sal 1 :	0,25 g/L
Fuente de Carbono 1 :	3 g/L
Fuente de Carbono 2 :	6,75 mL/L
Fuente de Carbono 4 :	0,77 mL/L
Fuente de Nitrógeno 1 :	14,42 mL/L
Fuente de Nitrógeno 2 :	0,848g/L

Anexo D. Caracterización sustratos alternativos



USUARIO: RUTH BONILLA
DIRECCION: C.I. TIBAITATA

DETPO: CUNDINAMARCA
MUNICIPIO: MOSQUERA
FINCA: C.I. TIBAITATA

MUESTRA: VARIAS
T. ANALISIS: Carbono Orgánico y Nitrogeno

RESULTADOS DEL ANALISIS DE COMPUESTOS ORGANICOS

Identificación Muestra	No Lab.	N	P	K	Ca	Mg	Na	S	C.O.	Fe	Cu	Mn	Zn	B	C/N	pH	C.E. dS/m
Melaza	183	0,16							67,5						422,7		
Levadura de Cerveza	184	6,68							80,7						12,1		
Levadura de Panadería	185	7,52							84,8						11,3		
Soya	186	5,88							72,1						12,3		

N.D.: No Detectable

Este resultado es única y exclusivamente para la muestra sobre la cual se han realizado las determinaciones.

Este documento no es valido para procesos de certificación del producto, solo es valido para fines de investigación y desarrollo del producto.

	Día	Mes	Año	Métodos de Análisis	
Fecha de Entrada	18	04	2008	N: Nitrógeno Total (Determinación Método de Kjeldahl)	Ca, Mg, K, Na: Determinación por Absorción Atómica
Fecha de Salida	07	05	2008	P: Fósforo Total (Det. Colorimétrica)	Elementos Menores (Cu, Fe, Mn, Zn):
				S: Azufre Total (Turbimetría)	Determinación por Absorción Atómica
				B: Boro (Determinación Colorimétrica)	C/N: Relación Carbono / Nitrógeno
				C.O.: Carbono Orgánico (Walkley - Black Modificado)	C.E.: Conductividad Eléctrica
				pH: Potenciométrico	
Vo.Bo. DIRECTOR DEL LABORATORIO					

Anexo E. Patrón Mac Farland

Concentración	Abs 559 nm
1	0,035
2	0,177
3	0,265
4	0,397
5	0,568
6	0,723
7	0,803
8	0,875
9	0,932
10	1,023

Ecuación de la recta: $y = 0,097x + 0,076$

$r^2 = 0,991$

Anexo F. Análisis Estadístico Plackett-Burman

Analysis Summary

File name: C:\User\Documents\CORPOICA\Diego Rivera\ANALISIS 3\P1.sfx

Estimated effects for Var_1

average = 9,14083 +/- 0,0313192

A:Factor_A = -0,0694444 +/- 0,0626384

B:Factor_B = 0,0105556 +/- 0,0626384

C:Factor_C = 0,0794444 +/- 0,0626384

D:Factor_D = -0,0783333 +/- 0,0626384

E:Factor_E = 0,0283333 +/- 0,0626384

F:Factor_F = -0,0783333 +/- 0,0626384

G:Factor_G = -0,0716667 +/- 0,0626384

H:Factor_H = -0,0872222 +/- 0,0626384

I:Factor_I = 0,118333 +/- 0,0626384

J:Factor_J = 0,0661111 +/- 0,0626384

K:Factor_K = 0,0505556 +/- 0,0626384

block = -0,0566667 +/- 0,0885841

block = -0,06 +/- 0,0885841

Analysis of Variance for Var_1

Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
A:Factor_A	0,0434028	1	0,0434028	1,23	0,2796
B:Factor_B	0,00100278	1	0,00100278	0,03	0,8677
C:Factor_C	0,0568028	1	0,0568028	1,61	0,2179

D:Factor_D	0,055225	1	0,055225	1,56	0,2242
E:Factor_E	0,007225	1	0,007225	0,20	0,6555
F:Factor_F	0,055225	1	0,055225	1,56	0,2242
G:Factor_G	0,046225	1	0,046225	1,31	0,2649
H:Factor_H	0,0684694	1	0,0684694	1,94	0,1777
I:Factor_I	0,126025	1	0,126025	3,57	0,0721
J:Factor_J	0,0393361	1	0,0393361	1,11	0,3027
K:Factor_K	0,0230028	1	0,0230028	0,65	0,4282
blocks	0,0612667	2	0,0306333	0,87	0,4339
Total error	0,776867	22	0,0353121		

Total (corr.) 1,36008 35

R-squared = 42,8806 percent

R-squared (adjusted for d.f.) = 16,7009 percent

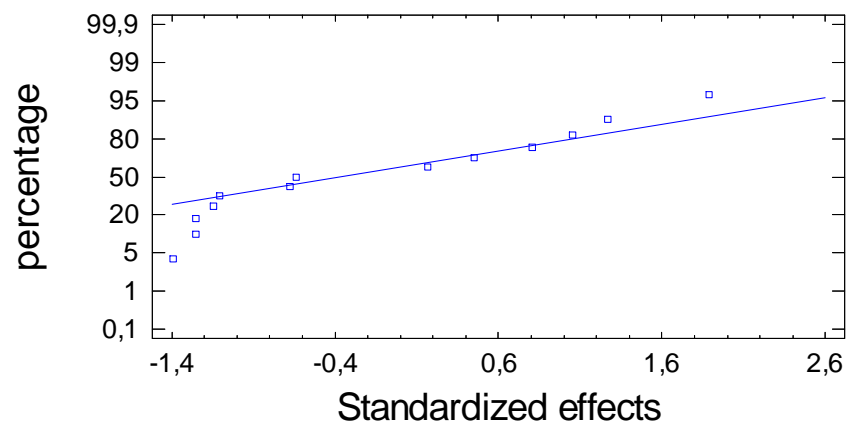
Standard Error of Est. = 0,187915

Mean absolute error = 0,0905556

Durbin-Watson statistic = 2,25872 (P=0,1764)

Lag 1 residual autocorrelation = -0,135891

Normal Probability Plot for Var_1



Coef. de regresión para Var_1

constante = 9,14083

A:Factor_A = -0,0347222

B:Factor_B = 0,00527778

C:Factor_C = 0,0397222

D:Factor_D = -0,0391667

E:Factor_E = 0,0141667

F:Factor_F = -0,0391667

G:Factor_G = -0,0358333

H:Factor_H = -0,0436111

I:Factor_I = 0,0591667

J:Factor_J = 0,0330556

K:Factor_K = 0,0252778

Anexo G. Análisis Estadístico Box-Behnken

Analysis Summary

File name: C:\User\Documents\CORPOICA\Diego Rivera\ANALISIS 3\P1.sfx

Estimated effects for Var_1

average = 9,04333 +/- 0,0630564

A:Factor_A = 0,0475 +/- 0,077228

B:Factor_B = 0,0875 +/- 0,077228

C:Factor_C = 0,01 +/- 0,077228

AA = 0,121667 +/- 0,113677

AB = 0,03 +/- 0,109217

AC = 0,115 +/- 0,109217

BB = -0,128333 +/- 0,113677

BC = 0,125 +/- 0,109217

CC = 0,0966667 +/- 0,113677

Analysis of Variance for Var_1

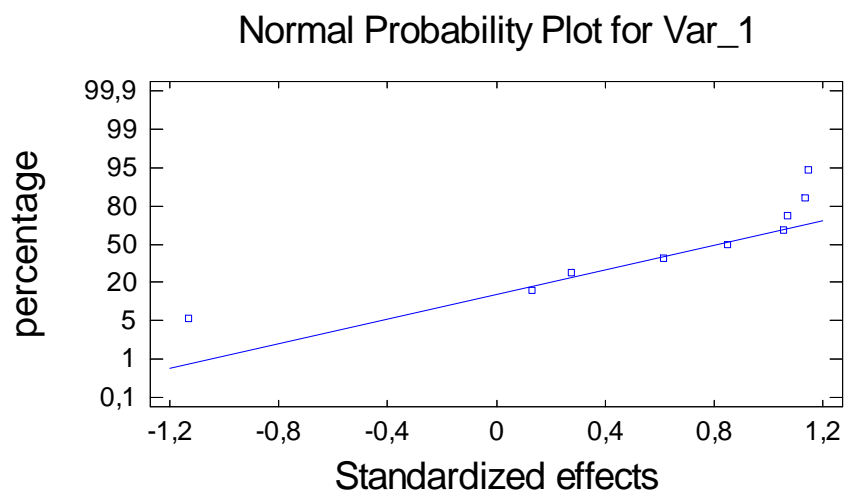
Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
A:Factor_A	0,0045125	1	0,0045125	0,38	0,5654
B:Factor_B	0,0153125	1	0,0153125	1,28	0,3086
C:Factor_C	0,0002	1	0,0002	0,02	0,9020
AA	0,0136641	1	0,0136641	1,15	0,3334
AB	0,0009	1	0,0009	0,08	0,7945
AC	0,013225	1	0,013225	1,11	0,3406
BB	0,0152026	1	0,0152026	1,27	0,3102
BC	0,015625	1	0,015625	1,31	0,3042
CC	0,00862564	1	0,00862564	0,72	0,4339
Total error	0,0596417	5	0,0119283		
Total (corr.)	0,149493	14			

R-squared = 60,1041 percent

R-squared (adjusted for d.f.) = 0,0 percent

Durbin-Watson statistic = 3,06215 (P=0,0052)

Lag 1 residual autocorrelation = -0,558113



Coef. de regresión para Var_1

constante = 9,04333

A:Factor_A = 0,02375

B:Factor_B = 0,04375

C:Factor_C = 0,005

AA = 0,0608333

AB = 0,015

AC = 0,0575

BB = -0,0641667

BC = 0,0625

CC = 0,0483333

Respuesta Optimizada

Meta: maximizar Var_1

Valor Optimo = 9,29539

Factor	Inferior	Mayor	Óptimo
--------	----------	-------	--------

Factor_A	-1,0	1,0	0,997891
Factor_B	-1,0	1,0	0,997869
Factor_C	-1,0	1,0	1,0