

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO
DIVISIÓN DE AGRONOMÍA
DEPARTAMENTO DE BOTÁNICA



Optimización de un Medio de Cultivo para Bacterias Solubilizadoras de Fósforo

Por:

VÍCTOR MANOLO JIMÉNEZ FLORES

TESIS

Presentada como requisito parcial para obtener el título de:

INGENIERO EN AGROBIOLOGÍA

Saltillo, Coahuila, México

Diciembre, 2013

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO
DIVISIÓN DE AGRONOMÍA
DEPARTAMENTO DE BOTÁNICA

Optimización de un Medio de Cultivo para Bacterias Solubilizadoras de Fósforo

Por:

VÍCTOR MANOLO JIMÉNEZ FLORES

TESIS

Presentada como requisito parcial para obtener el título de:

INGENIERO EN AGROBIOLOGÍA



Dr. Edmundo Mario Rodríguez Campos
Asesor Principal



Dra. Erika Vázquez Guzmán
Coasesor



Dra. Silvia Yudith Martínez Amador
Coasesor



Dr. Leobardo Bañuelos Herrera
Coordinación
Coordinador de la División de Agronomía

Saltillo, Coahuila, México

Diciembre, 2013

Agradecimientos

A la **Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro** por permitirme formarme como profesionalista, por cada nuevo conocimiento adquirido que me permitirá competir por un puesto laboral para desarrollar buenas actividades para beneficio conjunto de las personas para quienes trabaje y de quienes dependerán de mi labor.

Al Dr. Edmundo Rodríguez Campos, Responsable del proyecto por los conocimientos y experiencias compartidos, así como su contribución en esta investigación.

A la Dra. Erika Vázquez Guzmán, investigador del proyecto por su amistad y confianza para permitirme trabajar en este proyecto, así como la disponibilidad para mejorar esta investigación en todos sus aspectos.

A todos los **profesores de la universidad** que me impartieron clase, por su vocación de servicio, los conocimientos adquiridos así como las buenas y malas experiencias, que al final del camino me hicieron la persona que hoy en día soy.

A mis compañeros de generación CVI de Agrobiología Sergio, Jaime, Shimabuko, Efrén, Nicho, Javier, Cornelio, Etelberto, Eloy, Silverio, Vicky, Sandy, Jesy, Rosita, Angy, Betty, Olivia, Anabel, Karla, Irasema, Cristina, Leticia, Ofelia, Irene, etc.
Y demás compañeros y amigos que tuve durante mi transcurso en mi Alma Mater.

Por los momentos vividos, la complicidad que hubo entre muchos de nosotros, las risas, llantos, momentos buenos y malos, gracias a todos.

Dedicatoria

A mi madre Ricarda Flores Salazar, que nunca desistió en apoyarme y en hacerme creer que los sueños se vuelven realidad siempre y cuando te esfuerces en querer alcanzarlos, que sin tanto dudar puedes lograr lo que te propongas, que siempre debe haber pocas palabras y hacer lo suficiente para salir adelante. Y que sin duda lo que haces con sacrificio y esfuerzo siempre valdrá la pena y te dará un mejor sabor de boca, eso es lo que te inicia como persona independiente y te forja como persona, lo cual ayuda a que de una u otra forma estés mucho mejor con los demás.

A mis hermanos Hermenejildo, Elia, Francisca, Pablo, Elvira, Ángeles y Carol Yareli. Quien siempre fueron y han sido una fuente de sacrificio y confianza, ante todo siempre dando la mano entre hermanos, que si bien sacrificaron muchas cosas por mi, ahora en poco tiempo podre ayudarlos de la misma manera. Siempre dieron lo que tenían consigo para tratar que nada me faltara durante este lapso, así es nuestra cadena familiar, siempre dándonos la mano uno con otro, y salir adelante siempre como familia.

A mis sobrinos Carlos Antonio, Williams Mauricio, Fernando, Cesar Arturo, Alex y Miguel; mis sobrinas María Isabel, María Guadalupe Jennifer, Joselyn, Ivon, Valeria, Dayana y Guadalupe. Trataré en lo posible de que a ellos no les falte lo que me faltó en determinado momento y apoyarlos en lo mayor que se pueda, ya que son el futuro de la familia.

A cada uno de mis amigos que sin duda se puede contar con ellos en el momento que sea, José Carmen, Isabel, Gabriela, Guadalupe, Virginia, Victoria, Sandra, Maribel, Gelmy, Sergio, Jaime, Efrén, Brenda, Juan, Juan Pablo y algunos otros.

Gracias a todos.

“Caminante, no hay camino, se hace camino al andar”, esta frase describe todo lo que hoy se plasma en estas hojas, lo que se hizo y está por hacer...

Realmente no hay camino, existen trabas, trampas pero también guías y atajos, el caminante debe seguir..., confiar en su instinto y perseguir ese horizonte que no es más que aquello que le da sentido al vivir. Ese horizonte muchas veces se avizora tan claro, otras tan oscuro...

El caminante eres tú..., soy yo..., un alma en busca de razones y de sueños, en busca de dejar una huella en el camino que van marcando sus pies. Un alma que en el normal transcurso de su caminata, encuentra seres maravillosamente especiales que marcan su existir y se convierten en su atajo, su refugio, su fuente de inspiración, su guía y su razón

Contenido

.....	¡Error! Marcador no definido.
Agradecimientos.....	ii
Dedicatoria.....	iii
Índice de tablas.....	v
Índice de ilustraciones.....	vi
I. Resumen.....	vii
II. Introducción.....	1
III. Objetivos.....	3
IV. Hipótesis.....	3
V. Revisión de literatura.....	4
Biofertilizantes.....	4
Biofertilizantes en la agricultura.....	5
Importancia de los microorganismos en el suelo.....	6
Microorganismos solubilizadores de fósforo.....	7
Importancia del fósforo para las plantas.....	8
Producción de biofertilizantes de origen microbiano.....	9
Medio de cultivo.....	10
Nutrición bacteriana.....	11
Crecimiento bacteriano.....	13
Medición del crecimiento bacteriano.....	15
Condiciones ambientales para el crecimiento bacteriano.....	16
Temperatura.....	16
pH.....	17
Oxígeno.....	18
Agua.....	19
Biorreactores.....	20
Tipos de biorreactores.....	20
VI. Materiales y métodos.....	22
Materiales y reactivos.....	22
Cuenta viable.....	23
Medios de cultivo a evaluar.....	26
Diseño experimental.....	28
Variables.....	28
VII. Resultados y Discusión.....	29
VIII. Conclusiones.....	48
IX. Recomendaciones.....	48
X. Literatura citada.....	49
X. ANEXOS.....	1

Índice de tablas

Tabla 1 Clasificación nutricional de los microorganismos.....	11
Tabla 2 Rangos de temperatura para el crecimiento de diferentes tipos de bacterias (Frioni, 1999).	17
Tabla 3 Tipos de microorganismos con respecto a su pH en que se desarrollan	18
Tabla 4 Equipos empleados en este trabajo de tesis.	23
Tabla 5 Composición del medio MA	26
Tabla 6 Concentración de sales para 1 L de agua (cálculos de obtención de estas cantidades en Anexos).	27
Tabla 7 Modelo del experimento en base a concentraciones altas, medias y bajas de la fuente de carbono y nitrógeno.	31
Tabla 8 Análisis de varianza efecto del efecto de los niveles de sacarosa y nitrato de amonio (f) sobre las Log UFC (logUFC~sacarosa*fosfonitrato)	31
Tabla 9 Análisis de varianza del efecto de los niveles de sacarosa y nitrato de amonio (f) sobre la biomasa (biomasa~sacarosa*fosfonitrato)	31
Tabla 10 Modelo del experimento en base a concentraciones altas, medias y bajas de la fuente de carbono y nitrógeno.	35
Tabla 11 Análisis de varianza efecto del efecto de los niveles de sacarosa y nitrato de amonio (f) sobre las Log UFC (logUFC~sacarosa*fosfonitrato)	35
Tabla 12 Análisis de varianza del efecto de los niveles de sacarosa y nitrato de amonio (f) sobre la biomasa (biomasa~sacarosa*fosfonitrato)	36
Tabla 13 Modelo del experimento en base a concentraciones altas, medias y bajas de la fuente de carbono y nitrógeno.	39
Tabla 14 Análisis de varianza efecto del efecto de los niveles de sacarosa y nitrato de amonio (f) sobre las Log UFC (logUFC~sacarosa*fosfonitrato)	39
Tabla 15 Análisis de varianza del efecto de los niveles de sacarosa y nitrato de amonio (f) sobre la biomasa (biomasa~sacarosa*fosfonitrato)	39
Tabla 16 Modelo del experimento en base a concentraciones altas, medias y bajas de la fuente de carbono y nitrógeno.	44
Tabla 17 Análisis de varianza efecto del efecto de los niveles de sacarosa y nitrato de amonio (f) sobre las Log UFC (logUFC~sacarosa*fosfonitrato)	44
Tabla 18 Análisis de varianza del efecto de los niveles de sacarosa y nitrato de amonio (f) sobre la biomasa (biomasa~sacarosa*fosfonitrato)	44

Índice de ilustraciones

Ilustración 1 Correlación entre densidad óptica y las UFC/mL.....	25
Ilustración 2 Comportamiento de los tratamientos respecto a la variable UFC/mL en el ensayo 1.....	32
Ilustración 3 Comportamiento de los tratamientos respecto a la variable biomasa g/L en el ensayo 1.....	33
Ilustración 4 Interacción de la sacarosa con el nitrato de amonio (f).....	34
Ilustración 5 Comportamiento de los tratamientos respecto a la variable UFC/mL en el ensayo 2.....	37
Ilustración 6 Comportamiento de los tratamientos respecto a la variable biomasa g/L en el ensayo 2.....	38
Ilustración 7 Comportamiento de los tratamientos respecto a la variable UFC/mL en el ensayo 3.....	41
Ilustración 8 Comportamiento de los tratamientos respecto a la variable biomasa g/L en el ensayo 3.....	42
Ilustración 9 Interacción de la fuente de sacarosa con el nitrato de amonio, ensayo 3.	43
Ilustración 10. Comportamiento de los tratamientos respecto a la variable UFC/mL en el ensayo 4.....	45
Ilustración 11. Comportamiento de los tratamientos respecto a la variable biomasa g/L en el ensayo 4.....	46

I. Resumen

El objetivo de este estudio fue conocer las concentraciones de la fuente de nitrógeno y la de carbono que permiten la mayor producción de biomasa bacteriana de una cepa de bacteria solubilizadora de Fósforo. La presente investigación se llevó a cabo en el laboratorio de Agrobiotecnología en el Departamento de Ciencias Básicas de la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro y formó parte de un proyecto de investigación enfocado al desarrollo de un biofertilizante formulado con bacterias solubilizadoras de fósforo como ingrediente activo.

Se evaluó el crecimiento bacteriano y la producción de biomasa bacteriana en diferentes medios de cultivo con distintas concentraciones de fuente de carbono y nitrógeno. Se inició con tres fuentes de carbono: jarabe fructosado, lactosa y sacarosa y en las fuentes de nitrógeno: fosfonitrato y nitrato de potasio. Se realizaron ensayos preliminares para determinar la mejor combinación de fuente de carbono y nitrógeno; con los resultados obtenidos se descartó el jarabe fructosado por ser el medio en el que se registró el menor crecimiento y además se detectó acidificación del medio; se comparó la sacarosa con la lactosa y su interacción con el nitrato de potasio y fosfonitrato, encontrándose una mayor producción de biomasa en los medios con sacarosa y nitrato de potasio. Se cambió el nitrato de amonio (f) por el nitrato de amonio, ya que se presentaba un precipitado en los medios con nitrato de potasio, por ser una fuente con baja pureza de nitrógeno y ser de grado fertilizante. Por último se evaluó solo esta combinación adecuando las concentraciones, obteniendo los mejores rendimientos de biomasa en los medios con 30 g/L de sacarosa y 1.7 g/L de nitrato de amonio.

Palabras clave: bacterias solubilizadoras, medio de cultivo, crecimiento bacteriano, biomasa, carbono, nitrógeno.

II. Introducción

Debido al incremento en el costo de los fertilizantes químicos y a la contaminación que algunos provocan en el ambiente cuando se utilizan irracionalmente, es necesario encontrar nuevas alternativas de fertilización, económicas y más eficientes (Soria *et al.*, 2001). El impacto ecológico es importante en los sistemas de producción y el uso de productos amigables con el medio ambiente es elemental para preservar y mantener los recursos naturales. Así, la aplicación de biotecnologías, como el uso de microorganismos benéficos, permite, por ejemplo, sustituir de manera parcial o total la fertilización nitrogenada. Para ello, es importante la adecuada selección de microorganismos aplicables a diferentes cultivos y condiciones edafoclimáticas (Hernández, 2011). Así, la producción y comercialización de productos biofertilizantes está encaminada al fortalecimiento de sistemas de producción sostenible (Alarcón y Ferrera, 2000).

El fósforo constituye uno de los elementos más importantes para el desarrollo normal de las plantas, pero su inmovilización impide su correcto aprovechamiento por parte de los cultivos. El empleo de productos biotecnológicos como biofertilizantes desarrollados a partir de microorganismos, proporciona un resultado efectivo para la fertilización y absorción de los nutrientes del suelo, además de asegurar un producto sano y una renovación de la población bacteriana del suelo (Cepeda, 2008).

Los suelos agrícolas se encuentran en condiciones crecientes de empobrecimiento de fertilidad, causando bajas en la producción de distintos cultivos, así mismo, trayendo impactos ambientales severos, debido al uso ineficiente de los fertilizantes químicos.

Los biofertilizantes a base de microorganismos representan una opción clara para la disminución del uso de los fertilizantes químicos, propiciando la reestructuración del suelo y el aumento de la producción a un menor costo para el productor.

Todar (2002) mencionó, que es importante saber en qué medio pueden desarrollarse correctamente y las condiciones que debe tener el mismo, ya que cada microorganismo requiere encontrar en su medio todas las sustancias necesarias para

la generación de energía y para que la biosíntesis celular sea de forma adecuada. La composición del medio de cultivo puede influir sobre diferentes aspectos en la fisiología del microorganismo: su nutrición, multiplicación, la producción de metabolitos primarios y secundarios. Por ello, desde hace muchos años se diseñan medios con fines prácticos para fermentar poblaciones microbianas (Bernal *et al*, 2002). Echeverría (2007), evaluó el crecimiento de *Azotobactersp.* en el caldo Pikovskaya modificado recomendado por la literatura y un medio alternativo formulado a base de melaza; el biofertilizante obtenido en ambos medios de cultivo alcanzó concentraciones de 10×10^{10} UFC/ml, (unidades formadoras de colonia por mililitro) cumpliendo con los requerimientos de concentración del producto. Así mismo, Santillan, (2006) determinó que el medio de cultivo utilizado para la multiplicación de cepas de *Pseudomonassp.*, solubilizadoras de fósforo puede ser reemplazado por otros medios de cultivo de menor costo.

Becerra *et al* (2011), en su estudio aisló bacterias solubilizadoras de fósforo de suelos usados para el cultivo de uchuva, y evaluó el crecimiento de las cepas en los medios AG modificado, medio AG y medio BR utilizando como controles SMRS y SMRS1, encontrando que el medio BR puede ser una alternativa viable para el crecimiento de microorganismos solubilizadores de fosfato. A su vez, Fernández *et al.*, (2005) aislaron una bacteria del genero *Bradyrhizobium sp.*, de la rizosfera de soya, y se determinó el potencial solubilizador de fósforo de las cepas bacterianas en el medio NBRIP con halos mayores a 4mm.

Rivera, *et al* (2010), durante la formulación de un biofertilizante integrando bacterias fijadoras de nitrógeno, solubilizadoras de fósforo y sustratos inorgánicos, para el buen desarrollo del naranjo agrio, usaron el medio Pikovskaya para las bacterias solubilizadoras fósforo obteniendo resultados positivos, con una concentración de 9×10^{13} UFC/ml.

La presente investigación tiene como objetivo realizar la optimización de un medio de cultivo para bacterias solubilizadoras de fósforo, donde se pueda obtener la mayor producción de biomasa bacteriana.

III. Objetivos

Objetivo General.

Determinar la composición de un medio de cultivo de bajo costo para la producción comercial de un biofertilizante cuyo ingrediente activo es una cepa de bacteria solubilizadora de fósforo.

Objetivos específicos:

- Seleccionar los ingredientes del medio de cultivo que aporten el Carbono y el Nitrógeno necesarios para el crecimiento de la cepa bacteriana.
- Seleccionar la concentración adecuada de las fuentes de carbono y nitrógeno en el medio de cultivo para el óptimo desarrollo de la cepa bacteriana.

IV. Hipótesis

Una de las combinaciones de la fuente de carbono y del nitrógeno permitirá la producción máxima de biomasa bacteriana bajo las condiciones de cultivo utilizadas.

V. Revisión de literatura

Biofertilizantes

La necesidad apremiante de estrategias sostenibles y de bajo impacto agrícola en la agricultura requiere del desarrollo de preparados microbianos que mejoren la nutrición de las plantas (Peña, 2007). De esta manera se inició la producción de los biofertilizantes, Rojas y Moreno (2008) mencionan que son preparaciones o productos que contienen células de microorganismos vivas o latentes, las cuales activan el proceso biológico y son capaces de formar un compuesto fertilizante haciendo que la forma no disponible de algunos elementos esté disponible para las plantas. De la misma manera presentan ventajas agronómicas, ya que permiten una producción a bajo costo, protección del medio ambiente, mantienen la conservación del suelo desde el punto de vista de fertilidad y biodiversidad (Acuña, 2003). Dentro del término biofertilizante se incluyen aquellos basados en microorganismos fijadores de nitrógeno, solubilizadoras de fósforo y los microorganismos celulolíticos (Cepeda, 2008).

El beneficio que aporta la simbiosis entre microorganismos y las plantas ha sido bien documentado en diversos estudios, dando especial énfasis en los que respecta a la promoción del crecimiento y nutrición de plantas, especialmente aquellas de interés hortícola, frutícola y forestal (Alarcón y Ferrera, 1999 y Jeffries *et al.*, 2003).

Existen ejemplos del uso de biofertilizantes, tales como los resultados del estudio de Melano, (2004), el cual aisló bacterias del suelo, para luego seleccionar entre ellas las Gram negativas en forma bacilar para ser llevadas a aislamiento en medios selectivos de microorganismos quimioorgánicos. El crecimiento de estos microorganismos en estos medios selectivos representa una activación de la enzima nitrogenasa. Esta enzima tiene como función la fijación del nitrógeno de N₂ hacia

NO₃ forma en la que el suelo debe tener disponible el nitrógeno; al mismo tiempo cumpliendo con las necesidades para el desarrollo de un sistema de Compost tipo Windrow.

Rojas y Moreno, (2008), aislaron bacterias nativas del cultivo de arroz y las mezclaron en diferentes relaciones con sustancias húmicas, polietilenglicol, carbopol y quelatos, para crear un biofertilizante y mantener la viabilidad y estabilidad en almacenamiento y campo; el resultado de uno de los prototipos mostró un efecto benéfico sobre la producción (M=8,500 kg/ha) superando a los testigos (7,625 kg/ha), con esto se ratificó la importancia que tienen los microorganismos en los agroecosistemas.

Biofertilizantes en la agricultura

Una de las vías que se puede emplear para mejorar la fertilidad del suelo y lograr estimular la nutrición de las plantas es incrementar la población de microorganismos que ayudan en este proceso, partiendo de su inoculación a las plantas, las semillas o el suelo (Treto, *et al.*, 2005). La biofertilización incluye como agentes promotores del crecimiento vegetal, a hongos y bacterias benéficas del suelo (micorrizas y rizobacterias), así como desechos orgánicos a través de compostas y vermicompostas (Alarcón y Ferrara, 2000), donde siempre existe la intervención de microorganismos.

El uso de microorganismos promotores de crecimiento en la agricultura se denomina inoculación o biofertilización, es considerada una biotecnología que constituye al desarrollo ya que favorece el desarrollo de los cultivos agrícolas, beneficia al productor, y se ha descrito como ambientalmente segura, económica y socialmente aceptable (Aguirre, 2004)).

Existen diversos ejemplos del uso de los diferentes tipos de microorganismos usados en la producción de biofertilizantes. Terry *et al.*, (2005) realizaron una inoculación artificial de rizobacterias como biofertilizantes causando un efecto positivo sobre el crecimiento de las plántulas, así como en el estado nutricional de las plantas de

tomate, con un rendimiento agrícola superior a un 11% con respecto a las plantas testigo.

Las bacterias que habitan en la rizosfera pueden ser aisladas e inoculadas en los cultivos ejerciendo un efecto positivo sobre las plantas. Se ha demostrado que las rizobacterias inducen resistencia en las plantas contra enfermedades fúngica, bacterianas y virales y también han sido efectivas contra insectos y nematodos. Es importante resaltar que este enfoque de control biológico de patógenos mediante el uso de rizobacterias puede contribuir de manera substancial al desarrollo de una agricultura sustentable (López, 1992).

Al evaluar el efecto de la inoculación de dos rizobacterias probablemente del género *Rhizobium*, las cepas 33 y 45, y otra de naturaleza endofítica, la cepa M, en semillas de lechuga, se encontró que la cepa 33 y el consorcio 3345 incrementaron significativamente ($p < 0.05$) el peso seco de las plántulas con 30 días de edad en relación al testigo no inoculado. Aunque todas las cepas bacterianas produjeron AIA en ausencia y presencia de triptófano, éste no es el único parámetro implicado en la promoción del crecimiento de las plántulas de lechuga (Peña y Reyes, 2007).

La producción de caña de azúcar en Cuba ha sufrido considerables afectaciones desde el punto de vista financiero y climatológico, por lo que se hace necesario establecer sistemas de producción sostenibles que promuevan la elevación de los rendimientos agrícolas y protejan al medio ambiente. Se ha realizado la aplicación de biofertilizantes como alternativa de nutrición y propiciar una producción sostenible de caña de azúcar (Torriente, 2010).

Importancia de los microorganismos en el suelo

La fertilidad del suelo depende en gran parte de la actividad bacteriana; son absolutamente esenciales para todos los procesos vitales, ya que sin los procesos de putrefacción y desintegración no habría descomposición de la materia vegetal y animal muerta, lo cual trae consigo la liberación de sustancias químicas simples

como nitrato sódico, fosfato de calcio, cloruro de sodio y solubilización de fósforo (Bryan *et al*, 1971).

La diversidad y abundancia de los microorganismos del suelo dependen de su estructura, es decir, su profundidad, aireación, humedad, drenaje. Absorción, penetración radicular, pH, cantidad de materia orgánica, etc. Siendo la rizosfera la zona de influencia, debido a que cuenta con condiciones favorables para su desarrollo. Tomando así una importancia ecológica y biológica dentro del ecosistema del suelo, influyendo en el desarrollo radicular, absorción de nutrientes para la planta, la amonificación, nitrificación, simbiosis, solubilizadoras y oxidantes de algunos elementos no disponibles para la planta. Al mismo tiempo cumplen con funciones de grado antagónico contra patógenos (López, 1992).

Microorganismos solubilizadores de fósforo

En la agricultura sustentable desempeñan un papel primordial los procesos biológicos tales como: la asociación simbiótica de bacterias nitrificantes y bacterias solubilizadoras de fósforo, así como la utilización de materiales orgánicos. La solubilización del fósforo mineral, principalmente se lleva a cabo por bacterias de los géneros *Pseudomonas*, *Mycobacterium*, *Micrococcus*, *Bacillus* y *Flavobacterium* (López, 1992).

El empleo de bacterias solubilizadoras de fosfato (BSP) para la solubilización de distintas rocas fosfatadas y de otras fuentes de fósforo es una alternativa para incrementar la cantidad de P disponible para las plantas. Paredes (2010), menciona que los géneros *Pseudomonas*, *Pantoea* y *Burkholderia* mostraron halos de solubilización de fosfato de hasta 3.8 cm en 14 días en medio sólido, y en medio líquido se determinaron hasta 380 mg·mL⁻¹ de fosfato soluble a los 6 días.

Fernández *et al*, (2005), investigaron sobre la capacidad de solubilizar fosfato tricálcico de los grupos de bacterias predominantes en el suelo, de 250 cepas de *Bradyrhizobium* sp. y de 10 cepas de colección se probó en placa de Petri conteniendo el medio NBRIP con 5 g·L⁻¹ de fosfato tricálcico. Se midió el tamaño de

los halos de solubilización y se aislaron aquellas colonias que mostraban halos mayores a los 4 mm.

Importancia del fósforo para las plantas

La disponibilidad del fósforo está limitada, debido a que a pH alcalino existe en su forma básica PO_4^{3-} , que al combinarse con iones divalentes forma compuestos insolubles. Sin embargo, las plantas absorben únicamente el fósforo que está en la solución del suelo en forma de $\text{H}_2\text{PO}_4^{-1}$ (ion fosfato diácido). Por lo que cualquier fertilizante, ya sea de origen orgánico o mineral, debe transformarse primero en esas formas químicas antes de ser utilizado por el cultivo. (Teuscher *et al*, 1965).

El fósforo es un componente esencial de los vegetales, cuya riqueza media en forma de P_2O_5 es del orden del 0.5 al 1% de la materia seca. Se encuentra en parte en estado mineral, pero principalmente formando complejos orgánicos fosforados con lípidos, proteínas, carbohidratos, ácidos nucleicos y otros compuestos como la fitina (hexafosfato de inositol, una forma de almacenamiento de fósforo en las semillas). Juega un papel vital en todos los procesos que requieren transferencia de energía en la planta. Ya que los fosfatos de alta energía, encontrados en el adenosindifosfato (ADP) y en el adenosintrifosfato (ATP), son la fuente de energía que empuja una multitud de reacciones químicas dentro de la planta. Donde la transferencia de los fosfatos entre estos compuestos a otras moléculas (fosforilación) es el factor desencadenante de una gran cantidad de procesos celulares en las plantas (Afif, 2005).

Comúnmente, el fósforo forma parte de los compuestos fertilizantes más importantes para el agricultor, ya que el fósforo es considerado como un factor de crecimiento, al igual que el nitrógeno, sobre todo durante la primera fase del desarrollo de la planta, particularmente el radicular. Además aumenta la resistencia de la planta al frío y a las enfermedades. En términos generales, puede decirse que es un elemento regulador de la vegetación y por tanto, un factor de calidad, al favorecer los periodos de

vegetación que son críticos para el rendimiento del cultivo: maduración, fecundación y movimiento de las reservas (Guerrero, 1990). Las carencias de fósforo en las plantas se ponen de manifiesto por un follaje de color verde oscuro, casi azulado, acompañado por el amarillamiento y secado de la punta de las hojas y una ondulación característica, mostrando, a veces, manchas purpuras (Alexander, M. 1987).

El principal inconveniente del empleo de los fertilizantes minerales es que gran parte del fósforo suministrado tiende a acumularse en el suelo en forma de compuestos insolubles. En la materia orgánica se halla contenido en varios compuestos orgánicos complejos (lecitina, ácidos nucleicos, fitina, etc.) los cuales son atacados y descompuestos por las bacterias y hongos del suelo por medio de enzimas como la “fitasa” y diferentes esterases, liberándose el fósforo en forma de fosfatos o de ácido fosfórico (Teuscher *et al.* 1965).

Producción de biofertilizantes de origen microbiano

Los microorganismos realizan diferentes reacciones químicas, mineralización, inmovilización, oxidaciones, reducciones, fijaciones de algunos gases como nitrógeno, volatilización, solubilización etc. Estas reacciones finalmente se reflejan en las siguientes acciones; formación de humus, degradación de materia orgánica, control microbiano, fijar nitrógeno, etc. (Olalde y Serratos, 2004). Es por esta razón que Alarcón y Ferrera (2000) destacan la importancia y manejo de microorganismos benéficos de importancia para la agricultura.

Los biofertilizantes son productos con base en microorganismos que están involucrados en los procesos nutritivos de las plantas. Además de los microorganismos, es necesario mejorar las técnicas para la formulación de los productos para mantener la viabilidad (optimización de medio, fermentación y escalamiento) y estabilidad en almacenamiento y campo (Rojas y Moreno, 2008).

Las biotécnicas de fermentación utilizan bacterias, virus, hongos filamentosos, levaduras y algas unicelulares. Estos microorganismos poseen una velocidad metabólica muy alto debido a su dimensión microscópica que ofrece una superficie de contacto considerable con el producto tratado. Las fermentaciones microbianas tienen además la ventaja de ahorrar notablemente energía, ya que usan procedimientos suaves, es decir no requiere las altas temperaturas exigidas por fermentaciones tradicionales. La fermentación consiste en la multiplicación de microorganismos en un substrato biológico (glucosa, almidón de carácter celulósico, etc.) que les sirve de alimento (Arroyo, 1989).

Medio de cultivo

Gran parte de la investigación en microbiología depende de la capacidad de cultivar y mantener microorganismos en laboratorio, y esto solo es posible si se cuenta con los medios de cultivo adecuados (Willey *et al*, 2009), ya que el microorganismo requiere para su crecimiento de una fuente de energía y de fuentes de materia, que contenga todos los nutrientes que el microorganismo necesita para multiplicarse (Quintero, 1981).

El ambiente bioquímico (nutricional) se hace disponible como medio de cultivo, y dependiendo de las necesidades especiales de cada bacteria particular se ha desarrollado una gran variedad y tipos de medios de cultivo con diferentes propósitos y utilidades (Willey *et al*, 2009). Los microorganismos tienen la capacidad de usar el alimento como fuente de nutrientes y energía, obteniendo de ellos los elementos químicos que constituyen la biomasa bacteriana, aquellas moléculas que son indispensables para su crecimiento y que el organismo es incapaz de sintetizar (Adams y Moss, 1995).

De acuerdo Willey, *et al* (2009) la composición precisa de un medio dependerá de la especie que se desea cultivar, pues las necesidades nutricionales varían enormemente, (Quintero, 1981; Tortora *et al*, 2007) por ende la concentración de

nutrientes indispensables puede, hasta cierto punto, determinar la velocidad del crecimiento bacteriano. Por tal motivo el conocimiento del hábitat normal del microorganismo suele ser útil para seleccionar un medio de cultivo apropiado, ya que sus necesidades nutricionales son un reflejo de su entorno natural (Willey *et al*, 2009).

De acuerdo a Frioni (1999), los microorganismos se clasifican nutricionalmente por la naturaleza de su fuente de energía, por la fuente principal de carbono y por la naturaleza de los donadores de electrones.

Tabla 1 Clasificación nutricional de los microorganismos

Fuente de	Luz	Fotótrofos
Energía	Reacciones químicas	Quimiotrofos
Fuente de	Inorgánico – CO ₂	Autótrofos
Carbono	Orgánico	Heterótrofos
Donadores de	Inorgánico	Litotrofos
Electrones	Orgánico	Organotrofos

De igual manera emplean tres tipos de generación de energía, ya sea mediante la fermentación, fotosíntesis y/o respiración.

Nutrición bacteriana

Los nutrientes son sustancias empleadas para la biosíntesis y la obtención de energía, y son por tanto necesarios para el crecimiento microbiano (Willey *et al*

(2009). Un nutriente bacteriano debe contar con las siguientes características, de acuerdo con Frioni (1999):

- Poder atravesar la membrana celular por transporte pasivo o activo.
- Ser utilizado por alguna enzima de la célula.
- Proveer de energía o subunidades de las macromoléculas.

Desde que se idearon técnicas para cultivar microorganismos en condiciones de laboratorio, los microbiólogos se interesaron en descubrir los compuestos que utilizan los microorganismos como fuente de los elementos carbono, hidrógeno, oxígeno, nitrógeno, fósforo y azufre, elementos que representan la mayor parte del peso seco de los microorganismos (Rouse, 1969). El análisis de la composición de las células microbianas muestra que más del 95% de su peso seco está constituido por unos pocos elementos químicos: carbono, oxígeno, hidrógeno, nitrógeno, azufre, fósforo, potasio, calcio, magnesio y hierro. Estos elementos químicos reciben el nombre de macroelementos o macronutrientes porque son requeridos por los organismos en cantidades relativamente grandes. Los primeros seis elementos (C, H, O, N, S y P) forman parte de los carbohidratos, lípidos, proteínas, y ácidos nucleicos. El carbono es necesario para construir los esqueletos de todas las moléculas orgánicas que forman parte de los organismos. El hidrógeno y el oxígeno son útiles para el transporte de electrones y reacciones de óxido reducción. Para crecer, los microorganismos deben ser capaces de incorporar grandes cantidades de nitrógeno, fósforo y azufre. El nitrógeno es necesario para la síntesis de aminoácidos, purinas, pirimidinas, algunos carbohidratos y lípidos, cofactores enzimáticos y otras sustancias. Mientras que el fósforo está presente en los ácidos nucleicos, fosfolípidos, nucleótidos (como ATP), varios cofactores, algunas proteínas y otros componentes celulares. Así mismo, el azufre es necesario para la síntesis de sustancias como los aminoácidos cisteína y metionina, algunos carbohidratos, biotina y tiamina (Willey *et al*, 2009).

Los 4 elementos restantes se encuentran en la célula en forma de cationes, y desempeñan una variedad de funciones. Por ejemplo el potasio (K⁺) es necesario

para la actividad de varias enzimas, incluyendo algunas implicadas en la síntesis de proteínas. El (Ca^{2+}), entre otras funciones, contribuye a la resistencia al calor de las endosporas bacterianas. El magnesio (Mg^{2+}) sirve como cofactor para muchas enzimas, forma complejos con el ATP, estabiliza los ribosomas y las membranas celulares. El hierro (Fe^{2+} y Fe^{3+}) forma parte de los citocromos y es un cofactor de diversas enzimas y proteínas transportadoras de electrones.

Además de macroelementos, todos los microorganismos requieren otros nutrientes en pequeñas cantidades. Los micronutrientes: manganeso, zinc, cobalto, molibdeno, níquel y cobre, son esenciales para la mayoría de las células. Sin embargo, se requieren en cantidades muy pequeñas; por eso, las cantidades presentes (como contaminaciones) en el agua, el material de vidrio y los componentes habituales de los medios de cultivo ya suelen ser suficientes para el crecimiento. Los micronutrientes son normalmente parte de las enzimas y cofactores, y ayudan en la catálisis de las reacciones y en el mantenimiento de la estructura de las proteínas (Tortora *et al*, 2007).

Crecimiento bacteriano

Los microorganismos constituyen un importante grupo de organismos primitivos y simples, la mayoría unicelulares microscópicos y otros macroscópicos filamentosos o cenocíticos, capaces de realizar innumerables procesos biológicos, que han surgido muy temprano en la evolución, pero que se han adaptado a las condiciones ambientales actuales (Frioni, 1999).

Willey *et al* (2009), mencionaron que las bacterias se reproducen por fisión binaria causando un aumento en el número de células de una población. El crecimiento poblacional es estudiado mediante el análisis de la curva de crecimiento de un cultivo microbiano. Cuando se cultivan en medio líquido, suele hacerse en un cultivo discontinuo o sistema cerrado; es decir, los microbios son incubados en un recipiente cerrado al que no se añade (ni se quita) más cantidad de medio que la inicial. Por

tanto, las concentraciones de nutrientes disminuyen progresivamente, mientras que las concentraciones de residuos aumentan. El crecimiento de microorganismos que se reproducen mediante fisión binaria puede representarse gráficamente como el logaritmo del número de células viables frente al tiempo de incubación, resultando de ello 4 fases distintas:

a) Fase de latencia

Cuando se introducen microorganismos en un medio de cultivo fresco, generalmente no se produce un aumento inmediato del número de células. La necesidad de una fase de latencia, previa al comienzo de la división celular, puede ser debida a varias causas; el medio de cultivo puede ser diferente de aquel en el que el microorganismos estaba anteriormente, quizá las células estaban envejecidas o por la ausencia de cofactores esenciales y ribosomas. Los microbios requieren también de cantidades muy pequeñas de otros elementos minerales, como hierro, cobre, molibdeno y cinc (Tortora *et al*, 2007).

Quintero (1981) menciona que después de un periodo *lag*, el crecimiento ocurre a máxima rapidez y finalmente cesa, ya sea por carencia de un nutriente o por acumulación de un producto inhibitorio o algún cambio en el ambiente fisicoquímica.

b) Fase exponencial

Los microorganismos crecen y se dividen a la velocidad máxima posible que les permite su potencial genético, la naturaleza del medio, y las condiciones de cultivo. La duración de la fase exponencial de crecimiento depende parcialmente de la concentración inicial del sustrato limitante (Quintero, 1981); lo anterior implica que el cultivo pasa de un estado en el cual crece con exceso de sustrato a otro de carencia de sustrato, de manera que los periodos a velocidades menores que la máxima no son suficientemente largos para permitir al organismo ajustar su estructura interna a las nuevas condiciones.

c) Fase estacionaria

En un sistema cerrado, llega un momento en que el crecimiento de la población se detiene y la curva de crecimiento se hace horizontal. Los cultivos bacterianos suelen alcanzar esta fase, cuando la población asciende a unas 10^9 células por mililitro.

d) Fase de disminución prolongada

Debido al agotamiento de nutrientes y la acumulación de residuos dentro del medio, se pausa el crecimiento y reproducción bacteriana (Willey *et al*, 2009). Así mismo el número de muertes de células supera el número de nuevas células formadas y la población entra en fase de declinación.

Medición del crecimiento bacteriano

El crecimiento de las poblaciones bacterianas puede medirse de diferentes maneras. Algunos métodos determinan el número de células y otros la masa total de la población, que a menudo es directamente proporcional al número de células. La magnitud de la población normalmente se registra como el número de células que hay en un mililitro de líquido o en un gramo de material sólido (Tortora, *et al* 2007; Willey *et al*, 2009). Tales métodos son los siguientes:

- Recuentos en placa

Mediante esta técnica, solo se toma en cuenta las células viables y capaces de reproducirse.

- Filtración

Se emplea para el recuento de bacterias acuáticas empleando un filtro de membrana. El filtro es colocado sobre un medio sólido o sobre una esponja empapada en medio líquido y es incubado hasta que las células dan lugar a colonias separadas. Esta es una técnica útil para medir la pureza del agua.

- Turbidimetría

Este método es rápido y sensible, está basado en la dispersión de la luz por parte de

las células microbianas. Como todas las células microbianas de una población tiene un tamaño parecido, la intensidad de la dispersión es directamente proporcional a la biomasa de células presentes, y esta indirectamente relacionada con el número de células.

- Peso seco

El crecimiento de una población viene acompañado de un incremento de la masa celular total, no solo del número de células. Mediante este método las células de un cultivo en medio líquido son recogidas mediante centrifugación, para seguidamente ser lavadas, secadas en un horno, y pesadas.

Condiciones ambientales para el crecimiento bacteriano

Frioni (1999) y Quintero (1981) mencionan que existen tres tipos de factores que afectan el crecimiento bacteriano, ya sea en vida libre o en cultivos aislados. Por comodidad se dividen los factores del ambiente en:

- Físicos, como la temperatura, gases, presión osmótica, pH
- Químicos, o físico-químicos: nutrientes, sustancias antimicrobianas
- Biológicos, otros organismos: microorganismos, micro y meso fauna, la vegetación, afectan también las actividades microbianas.

Temperatura

Cada organismo exhibe unas temperaturas mínima, óptima y máxima a las cuales puede haber crecimiento. Estas temperaturas se conocen con el calificativo de cardinales y son en gran parte, típicas de un determinado organismo. En base a sus temperaturas cardinales los microorganismos pueden ser clasificados en varios grupos fisiológicos (Adams y Moss, 1995; Frioni, 1999):

Tabla 2 Rangos de temperatura para el crecimiento de diferentes tipos de bacterias (Frioni, 1999).

Tipos	Rango de temperatura	Óptimo
Sicrofilos	0 – 20°C	15 °C
Mesofilos	15 – 45 °C	35 °C
Termófilos	40 – 70 °C	55 °C

Uno de los factores más importantes que influye en el efecto de la temperatura sobre el crecimiento, es la sensibilidad a la temperatura de las reacciones catalizadas por enzimas. Cuando los organismos se encuentran por encima de su temperatura óptima, se ven afectadas tanto la función como la estructura celular. Si las temperaturas son muy bajas, se afecta a la función pero no necesariamente a la composición química y la estructura de la célula (Willey *et al*, 2009).

pH

Aunque los microorganismos pueden crecer en amplios intervalos de pH, con valores lejanos de sus óptimos, existen límites para esta tolerancia. Las variaciones drásticas del pH citoplasmático pueden dañar a los microorganismos debido a la alteración de la membrana plasmática o a la inhibición de la actividad de enzimas y de proteínas y transportadoras de membrana. Los cambios del pH externo también pueden alterar la ionización de las moléculas de nutrientes, y de este modo reducir su disponibilidad para el organismo (Willey *et al*, 2009; Tortora *et al*, 2007).

Frioni, (1999), menciona que si bien el pH interno de las células es neutro, los microorganismos poseen mecanismos de control de entrada y salida de protones y cationes a nivel de la membrana y pueden desarrollarse en amplios rangos de concentración hidrogénica:

Tabla 3 Tipos de microorganismos con respecto a su pH en que se desarrollan

Tipos	Rango de pH	Óptimo
Acidófilos	0 – 7	5
Neutrófilos	5 – 12	7
Basófilos	9 – 14	10

Oxígeno

La importancia del oxígeno para el crecimiento de un organismo está directamente relacionada con su metabolismo; en particular, con los procesos que emplea para conservar la energía obtenida de su fuente energética (Willey *et al*, 2009; Tortora, *et al*, 2007).

El oxígeno es necesario dependiendo del tipo de microorganismo, por ello de acuerdo a su necesidad, se han dividido en (Frioni, 1999):

- Aerobios
 - Obligados: Requieren de oxígeno para crecer (21 %)
 - Facultativos: No requieren pero crecen mejor en presencia de oxígeno.
- Microaerófilos: Requieren, pero a niveles más bajos que los atmosféricos (1-15 %)
- Anaerobios

- Aerotolerantes: No requieren y crecen mejor cuando el oxígeno está presente.
- Obligados: La presencia de oxígeno es letal

Agua

La vida tal como la conocemos depende totalmente de la presencia del agua en estado líquido. Las reacciones que tienen lugar en el citoplasma transcurren en un medio acuoso y el citoplasma está rodeado por una membrana que generalmente es permeable a las moléculas de agua, las cuales pueden pasar libremente del citoplasma al medio y del medio al citoplasma (Adams y Moss, 1995; Tortora, *et al*, 2007). Frioni (1999), menciona que la humedad afecta la actividad microbiana en dos aspectos: un cierto nivel es necesario ya que el agua es un nutriente esencial y las reacciones bioquímicas se realizan solamente en medio acuoso, pero cuando el aporte es excesivo se limita la difusión del oxígeno, creándose condiciones anaerobias. La máxima densidad bacteriana se encuentra en niveles de humedad comprendidos entre el 50 y el 75% de la capacidad de campo. La saturación trae aparejada disminución en las bacterias aerobias y aumento de las anaerobias.

Las variaciones de la concentración osmótica del entorno pueden afectar a los microorganismos, ya que la membrana plasmática presenta permeabilidad selectiva. Si se coloca a un organismo en una solución hipotónica (con menor concentración osmótica que la del citoplasma), el agua entrará a la célula y hará que esta explote, si no hay nada que impida esta entrada. A la inversa, si el microorganismo es colocado en una solución hipertónica (con mayor concentración osmótica que la del citoplasma), el agua saldrá de la célula (Willey *et al*, 2009).

Biorreactores

Biorreactor es un recipiente usado para la fermentación con instrumentos capaces de controlar las condiciones ambientales, dentro del mismo para el óptimo desarrollo del microorganismo cultivado (Tortora *et al*, 2007).

Como todos los seres vivos, los microorganismos crecen, se reproducen y segregan algunos compuestos bioquímicos de importancia para el hombre. Estas características en que se ha basado la utilización de los microorganismos como productores de fermentación en un biorreactor. Para que una fermentación se realice son necesarios los siguientes requisitos: tener un microorganismo de características idóneas para el proceso y/o producto particular, proveer un medio de cultivo adecuado (que contenga todos los nutrientes esenciales en las proporciones y cantidades óptimas de producción) y, finalmente, establecer y controlar las condiciones fisicoquímicas necesarias para el desarrollo de la fermentación. Como resultado se obtendrá una cantidad de microorganismos mayor que la inicial y diversos productos (antibióticos, esteroides, enzimas, ácidos orgánicos, etc.). Todo fermentador debe cumplir con dos requisitos fundamentales: mantener un medio homogéneo sin zonas muertas y a la vez transferir oxígeno al medio empleando el mínimo de energía posible (Quintero, 1981).

Tipos de biorreactores

A nivel de laboratorio y de planta piloto existen muchos tipos de fermentadores, pero a escala industrial y en operación son cuatro los tipos principales: el Waldoholf, el de turbina, columna burbujeadora y el *airlift*. De los 4 tipos, el fermentador de turbina es el más usado en fermentación por ser capaz de suministrar altas cantidades de oxígeno por unidad de tiempo y volumen (Quintero, 1981).

Estudios recientes de Lizardi (2011), obtuvo mediante la modelación de un fermentador *airlift* buenos resultados al incrementar la eficiencia (rendimiento y

productividad) de la producción de un consorcio microbiano degradador de petróleo con un menor gasto de energía, así mismo logró el estudio de un bioproceso con transferencia de masa y reacción (degradación de HXD y crecimiento microbiano al mismo tiempo. Mientras que los resultados obtenidos por Morales (2008), muestran que el crecimiento de biomasa de los cultivos celulares de *J. mexicana* se incremento en un 17% en el biorreactor airlift y en el de columna de burbujeo, mientras que en el tanque de agitado mecánicamente este incremento fue del 21%. La actividad proteolítica obtenida en los biorreactores de columna de burbujeo y airlift fue del mismo orden de magnitud, en cambio en el biorreactor de tanque agitado la actividad fue mayor. El cultivo en biorreactores no provocaron disminución en la producción de enzimas proteolíticas, ni cambio significativo en la viabilidad y morfología celular (Morales, 2008).

En la investigación de Cruz (2007) se demostró que la inyección de aire en procesos de fermentación líquida usando biorreactores airlift, tienen un efecto directo sobre la velocidad de agitación, la velocidad de crecimiento y morfología, así como sobre la producción de metabolitos secundarios y biomasa en diferentes microorganismos (Cruz, 2007), asumiendo de esta manera la eficiencia con que trabaja este biorreactor. De tal manera que en la fermentación del *Lactococcus lactis* para la producción del complejo enzimático que genera un biopolímero a partir de glucosa, se presenta extrema limitación de oxígeno. Se implementó un sistema de aireación externo con un microburbujeador de acero sintetizado y recirculación de medio de cultivo, acoplado a fermentadores del tipo tanque de agitado, mostrando efectos positivos, ya que favorece la transferencia de oxígeno de la fase gaseosa a la fase líquida, valores similares a los reportados por biorreactores airlift (Soler, 2009).

VI. Materiales y métodos

Ubicación del sitio

La presente investigación se llevó a cabo en el laboratorio de Agrobiotecnología en el Departamento de Ciencias Básicas, el cual se encuentra dentro de las instalaciones de la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro, ubicada en Buenavista, Saltillo, Coahuila.

Materiales y reactivos

a) Material biológico.

Se usaron las bacterias CBNG-14 (*Pantoeaanatis*) y la CBLA-177 (*Pseudomonas brassicacearum*), que fueron aisladas de la rizosfera de solanaceas. Previamente ya habían sido estudiadas como unas de las cepas con mayor índice de solubilización de fósforo.

b) Material químico

Para la solución de microelementos se usaron los siguientes reactivos: sulfato ferroso heptahidratado, sulfato manganoso hidratado, sulfato de zinc heptahidratado, sulfato cúprico pentahidratado y molibdato de amonio. Para la preparación del medio de cultivo: sacarosa, lactosa, jarabe fructosado, nitrato de amonio grado fertilizante, nitrato de potasio, sulfato de magnesio heptahidratado, sulfato de amonio, fosfato de potasio, fosfato di-potásico y solución de microelementos. Los cuales fueron de las siguientes marcas: Analytyka, Bioxon, CTR, Fermont y Jalmek, grado reactivo.

c) Equipo

Tabla 4 Equipos empleados en este trabajo de tesis.

Aparato	Marca	Modelo
Incubadora	Novatech	E160-AIA
Centrifuga	ThermoScientific	3L 40 R
Campana de flujo laminar	Novatech	CFLV-90E
Espectrofotómetro	ThermoScientific	Génesis 10-s UV Scanning
pH metro	Conductronic	45-02-188
Autoclave	Novatech	EN-30
Shacker	ThermoScientific	Max Q 5000
Estufa de secado	Novatech	HS45-AIA
Balanza analítica	AND	GF-200
Balanza analítica	AND	H-120
Microondas	Panasonic	NN-8655WM
Ultracongelador	ThermoScientific	Revco VALUE PLUS

Cuenta viable

Una de las formas para evaluar el crecimiento bacteriano fue por turbidimetría, para lo cual fue necesario establecer la relación entre los valores de absorbancia del espectrofotómetro versus el número de bacterias presentes en el medio. Esta relación se estableció cultivando la bacteria en medio líquido y posterior a

cuantificación del número de bacterias viables en éste, mediante la determinación del número más probable presente en diferentes diluciones del cultivo. Esto fue realizado de la siguiente manera:

Inicio de un cultivo clonal

Se tomó un cristal de una muestra del cultivo de la cepa CBLA177 que se conserva congelada a -80°C y se inoculó por estrías una placa de agar nutritivo. Ésta fue incubada durante 48 horas a 27°C en una incubadora bacteriológica. De este cultivo se tomó una muestra de una colonia claramente separada de las otras para iniciar el cultivo en medio líquido.

Crecimiento de la bacteria en medio líquido

Con la muestra de la colonia se inoculó un tubo de ensaye de 10 mL que contenía 3 ml de medio MA y se incubó por 18 h a 30°C y 200 rpm en la incubadora con agitador rotatorio (shaker). Este cultivo sirvió a su vez como inóculo de otro cultivo en matraz de 150 mL con 30 mL de medio MA, que de nuevo fue incubado por 18 h a 30°C y 200 rpm. Al final de la incubación se tomaron 11 muestras del cultivo y se ajustó su densidad óptica a 0.1, 0.2, 0.3,....., 1.1 Unidades de DO a 660 nm.

Determinación de las UFC mediante el número mas probable

Para cada muestra con diferente DO se prepararon diluciones seriadas de la suspensión bacteriana usando solución salina en relación 1:10 desde 0.1 hasta 1×10^{-10} . De cada dilución se tomaron 100 μL para inocular 3 placas con AN, que se incubaron durante 48 h a 30°C . En aquellas placas donde hubo crecimiento bacteriano y éste fue de menos de 400 colonias, se procedió al conteo de colonias. El número de colonias en las placas que tuvieron entre 20 y 300 se usó para calcular

el número total de células multiplicando por la dilución de la que procedieron las placas. El número obtenido para cada muestra de DO se utilizó para establecer la correlación al graficar número de células versus DO. De lo cual resultó la siguiente fórmula, que sirvió para determinar las UFC/mL en los medios evaluados posteriormente:

$$Y=4E8*e^{8.3247x} \text{ (Formula 1)}$$

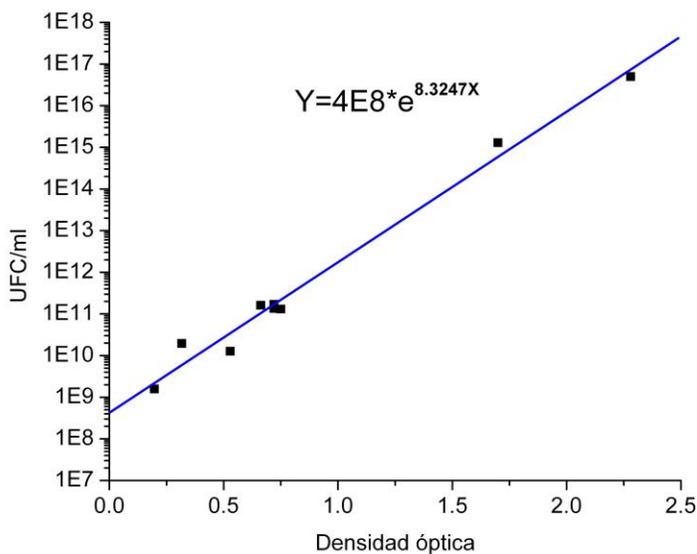


Ilustración 1 Correlación entre densidad óptica y las UFC/mL

Cultivo de la bacteria

Los medios para el cultivo estándar de la bacteria y para contar con inóculos en las fermentaciones de prueba de medios de cultivo, fueron el medio MA y AN (agar nutritivo)

a) Medio líquido MA

Tabla 5 Composición del medio MA

Reactivo	g/l
KH ₂ PO ₄	0.4
K ₂ HPO ₄	0.1
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.2
NaCl	0.1
CaCl ₂	0.02
FeSO ₄ ·7H ₂ O	0.02
Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	2 mg
Ácido Málico	5.0
Extracto de levadura	2.0
Agar bacteriológico	15.0
KOH	4.5

b) Medio sólido de agar nutritivo (AN)

Se preparó a razón de 24 g por litro de agua. El medio se calentó en microondas y se agitó hasta lograr su completa disolución. Se pasó a varios matraces de 500 ml y se esterilizó a

120°C, 15 psi durante 15min.

El medio estéril se distribuyó en cajas petri a razón de aproximadamente 15 ml por caja. Esta operación se realizó en una campana de flujo laminar. En este medio se realizó la reactivación bacteriana a partir de las muestras congeladas.

Medios de cultivo a evaluar

a) Reactivación de la bacteria e inoculación de los diferentes medios de cultivo.

Se tomó una muestra de la cepa CBLA 177 contenida en un microtubo dentro del ultracongelador. Dentro de la campana de flujo laminar se realizó la siembra de la bacteria en una caja de Petri con agar nutritivo, mediante la técnica de estría cruzada. Enseguida se dejó incubar la cepa durante 48 h a 25°C.

Llevar la placa a la campana para inocular de 1 a 4 tubos de 10mL con medio MA, incubarlos en el shacker durante 18 h a 25°C y 200 rpm.

Tomar los tubos y pasar su contenido a matraces con MA y incubar en el shacker por

18h a 25°C y 200 rpm.

Después del tiempo transcurrido tomar lectura de la Densidad Óptica (DO) del medio y ajustar una DO >0.7, para inocular los matraces con los medios a evaluar con 100µl cada uno.

b) Preparación de los medios de cultivo

Se usaron las siguientes concentraciones de las fuentes de carbono y nitrógeno inicialmente, lo cual con los resultados de cada ensayo se fue cambiando, para realizar la optimización del medio.

Se inició con las siguientes cantidades de las fuentes de carbono: jarabe fructosado al 42% de fructosa 107.14 g/l; lactosa, 25 g/l y sacarosa 70 g/l y las fuentes de nitrógeno: nitrato de amonio (f)¹, 2.4 g/l y nitrato de potasio, 2.4g/l.

Los valores de las sales se mantuvieron estables.

Tabla 6 Concentración de sales para 1 L de agua (cálculos de obtención de estas cantidades en Anexos).

Reactivo	g/L
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.44
(NH ₄) ₂ SO ₄	0.58
KH ₂ PO ₄	3.5
K ₂ HPO ₄	2.15
Solución de microelementos	1 mL

Cada cultivo se realizó en matraces de 150 ml con 30 ml de medio; los matraces fueron llevados a esterilizar en la autoclave por 15 minutos a 120 °C. Se inocularon con la cepa reactivada previamente y se incubaron durante 18 h a 200 rpm y 30 °C.

Al término de la fermentación se tomó la lectura de DO en el espectrofotómetro y se

¹(f) significa grado fertilizante)

midió el pH. Después el cultivo se transfirió a tubos de 30 ml previamente pesados, se centrifugaron a 5000 rpm por 15 minutos a 6°C, se eliminó el sobrenadante y la pastilla bacteriana se enjuagó con solución salina y se volvió a centrifugar. Se retiró el sobrenadante y se llevaron a la estufa de secado y se colocaron ahí por 48 horas a 70°C, para después tomar la lectura de peso seco (biomasa).

El primer ensayo tuvo como finalidad observar el color de los medios de cultivo y ver la conveniencia de cada uno. Se observó que si las fuentes de carbono y nitrógeno ya van mezcladas durante la esterilización, algunos medios se caramelizan, lo cual no es apropiado ya que se necesita que el color del medio sea transparente para poder evaluar la densidad óptica. Por tanto, se optó por esterilizar las fuentes de carbono y nitrógeno por separado y mezclarlas sucesivamente.

Los siguientes ensayos tuvieron como objetivo encontrar las combinaciones de carbono y nitrógeno adecuadas y descartar las combinaciones menos rendidoras. Tal fue el caso de omitir el uso de jarabe fructosado, ya que el medio se acidificaba demasiado, inhibiendo el crecimiento de la bacteria. En ensayos posteriores se descartó el uso de la lactosa, quedando solamente la sacarosa.

Durante la investigación se tuvo problemas con el Nitrato de Potasio, el cual se precipitaba en el medio y se optó por preparar una fuente más pura de nitrógeno: Nitrato de Amonio.

De esta manera los ensayos siguieron su rumbo, optando por ultimo por la combinación de sacarosa con Nitrato de Amonio.

Diseño experimental

Para la evaluación de los resultados obtenidos se utilizó el programa estadístico R, teniéndose un modelo factorial completo, con 6 medios diferentes y 5 repeticiones cada uno.

Variables

Para evaluar los medios de cultivo se tomaran en cuenta los datos de pH, UFC/mL y Biomasa bacteriana.

VII. Resultados y Discusión

Para la evaluación de los medios se utilizó un modelo factorial completo, se utilizó el paquete estadístico R para la evaluación de los datos, realizando un análisis de varianza y comparación de medias de las siguientes variables: UFC/mL, pH y Biomasa (g/L).

De acuerdo a niveles teóricos de los elementos que componen las bacterias: C (45.6%), H (7.6%), O (30.2%), N(12.1%) y cenizas (5.5) (Biotechnology and Bioengineering 17, 227 (1975), usando también los datos teóricos de rendimiento de fructosa ($Y_s=0.4$), sacarosa ($Y_s=0.25$) y lactosa ($Y_s=0.5$), reportadas por Quintero (1981); se realizaron los cálculos correspondientes para obtener las concentraciones de las diferentes fuentes de carbono y nitrógeno usados en los experimentos. De acuerdo con esto, se tomó como meta alcanzar 20 g/l de peso seco, manteniendo una relación C/N 25/2. Rivera (2008) menciona que si se mantiene una buena relación 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. Arias *et al* (2011) observaron que la disminución de la relación 25/2 C/N no afectó la velocidad específica de crecimiento y originó un ligero aumento en la concentración de biomasa de la bacteria *R. etli*. Sin embargo, cuando se utilizó una relación C/N mayor, la velocidad específica de crecimiento y la concentración de biomasa disminuyeron.

Se realizaron ensayos preliminares basados en la obtención de 20 g/L de acuerdo a la literatura citada. La finalidad de los ensayos fue determinar si las concentraciones calculadas de las fuentes de carbono y de nitrógeno eran las adecuadas para obtener buenos rendimientos de biomasa. También se encontró que la concentración de la fuente de nitrógeno era muy alta y en lugar de promover, inhibía el crecimiento de las bacterias, por lo que se decidió disminuir la concentración de la fuente de nitrógeno.

Los primeros ensayos estuvieron enfocados a elegir una fuente de carbono. Se inició teniendo 3 fuentes de carbono: jarabe fructosado al 42 % (107.14 g/L), lactosa (25

g/L) y sacarosa (70 g/L) y misma concentración para las fuentes de nitrógeno, fosfonitrato y nitrato de potasio (2.4 g/L). Se tomaron valores un 110% y 90% de la concentración normal.

Con los resultados del primer ensayo se descartó el uso del jarabe fructosado, ya que se encontró poco crecimiento (no se muestran resultados), además de una caramelización del medio, lo cual interfería en la toma de datos.

El proceso de esterilización está basado en alcanzar temperaturas y presiones muy altas, en cuanto a temperatura se alcanzan 120 °C y presiones de 1.2 atm, por tanto la caramelización se da durante este proceso, ya que la fructosa se carameliza a los 110 °C, mientras que la sacarosa y lactosa es por encima de los 160 °C .

Se realizaron 2 ensayos seguidamente donde se repitió con la sacarosa y la lactosa, encontrando que con ambas fuentes de carbono restantes se obtenían buenos resultados de crecimiento (UFC) y biomasa. Sin embargo para la disminución de costos y en base a los mejores resultados se eligió a la sacarosa con el nitrato de amonio (f) (no se muestran resultados).

ENSAYO 1

El siguiente ensayo se evaluó 9 tratamientos con 4 repeticiones, con las siguientes concentraciones:

De acuerdo a los resultados obtenidos en los ensayos preliminares la concentración alta de nitrógeno podría ser toxica para las bacterias inhibiendo su crecimiento, por tal razón se bajaron sus concentraciones, tomando como óptima o media la de 2 g/L, tomando valores un 10 % por encima de este valor y un 10 % menor para las concentraciones alta y baja. Los niveles de sacarosa se mantuvieron.

Tabla 7 Modelo del experimento en base a concentraciones altas, medias y bajas de la fuente de carbono y nitrógeno.

Ingrediente	Concentración alta (g/L)	Concentración media (g/L)	Concentración baja (g/L)
Sacarosa	80	70	60
Nitrato de amonio (f)	2.20	2	1.8

*(f) grado fertilizante

*Tabla 8 Análisis de varianza efecto del efecto de los niveles de sacarosa y nitrato de amonio (f) sobre las Log UFC (logUFC~sacarosa*fosfonitrato)*

	GL	SC	CM	Valor de F	Pr (>F)
Sacarosa	1	0.000	0.0001	0.000	0.989
Nitrato de amonio (f)	1	0.345	0.3446	0.953	0.336
Interacción	1	0.121	0.1209	0.334	0.567
Residuales	32	11.576	0.3617		

* (f) grado fertilizante

*Tabla 9 Análisis de varianza del efecto de los niveles de sacarosa y nitrato de amonio (f) sobre la biomasa (biomasa~sacarosa*fosfonitrato)*

	GL	SC	S CM	Valor de F	Pr (>F)
Sacarosa	1	0.0167	0.01675	0.990	0.3273
Nitrato de amonio (f)	1	0.0569	0.05694	3.365	0.0759
Interacción	1	0.0000	0.0000	0.0000	0.9985
Residuales	32	0.5415	0.01692		

* (f) grado fertilizante

El ANOVA para este ensayo no demostró diferencias significativas entre tratamientos para las UFC y la biomasa (tabla 8 y 9).

Numéricamente se aprecia una tendencia tanto de número de bacterias (UFC), como

de la biomasa, los tratamientos con niveles altos de nitrato de amonio (f), resultaron ser los de mejores resultados, independiente del nivel de sacarosa con que interaccionan.

Sin embargo el ANOVA para biomasa mostró un ligero efecto ($\alpha=0.1$) del nitrato de amonio (f) (tabla 9), lo cual se puede observar en la gráfica de interacción, siendo el mejor medio la combinación de sacarosa bajo con nitrato de amonio (f) alto con una media de 0.950 g/L y de menor biomasa fue la combinación de la sacarosa media con nitrato de amonio (f) bajo con una media de 0.733 g/L, lo cual es muy claro en la siguiente gráfica de interacción entre la sacarosa y el nitrato de amonio (f) (Ilustración 3 y 4).

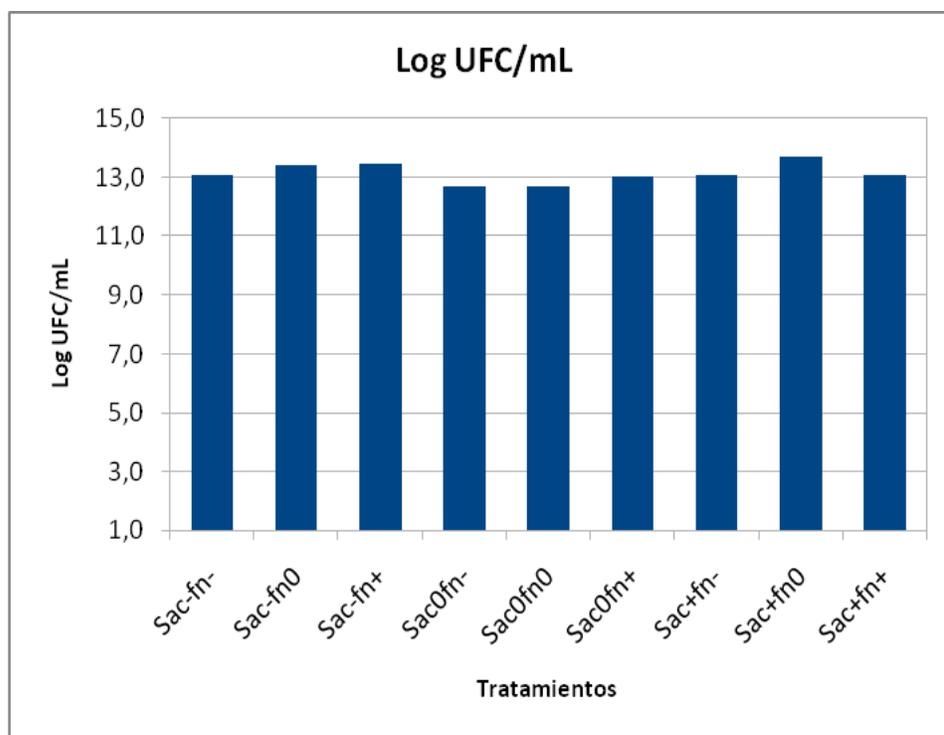


Ilustración 2 Comportamiento de los tratamientos respecto a la variable UFC/mL en el ensayo 1.

Simbología: sac(sacarosa), fn (nitrato de amonio (f)), (+) nivel alto, (0) nivel medio y (-) nivel bajo.

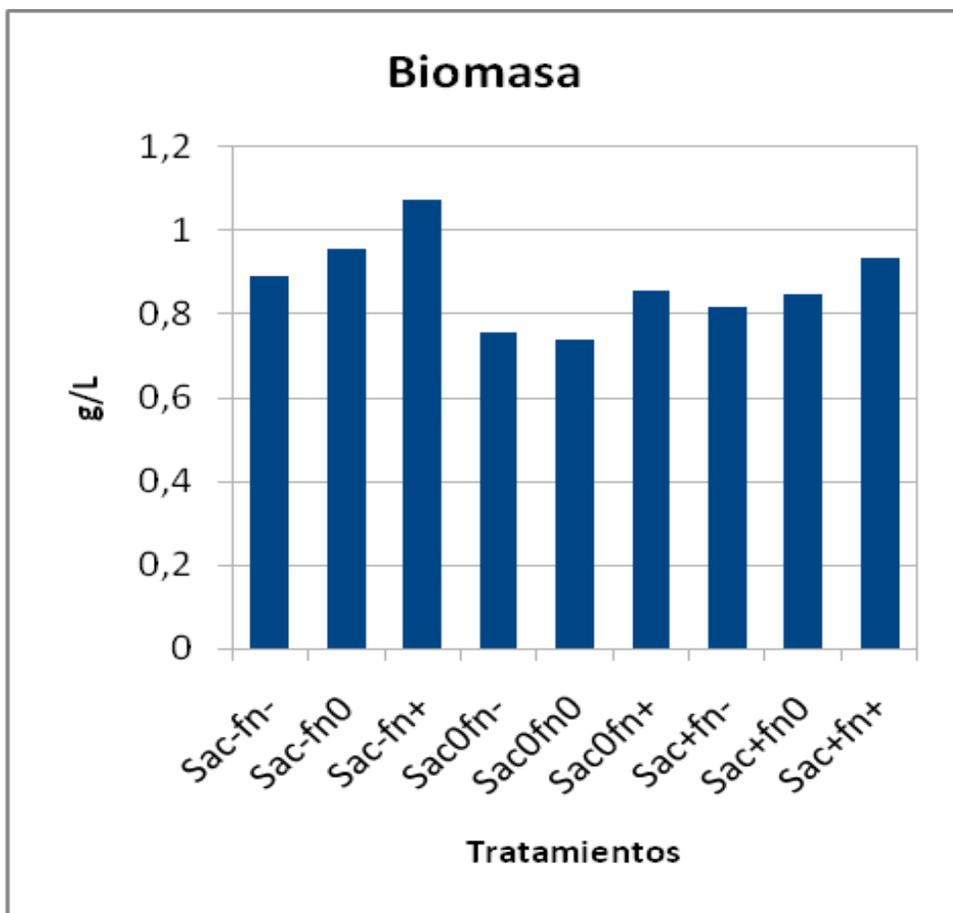


Ilustración 3 Comportamiento de los tratamientos respecto a la variable biomasa g/L en el ensayo 1.

Simbología: sac(sacarosa), fn (nitrato de amonio (f)), (+) nivel alto, (0) nivel medio y (-) nivel bajo.

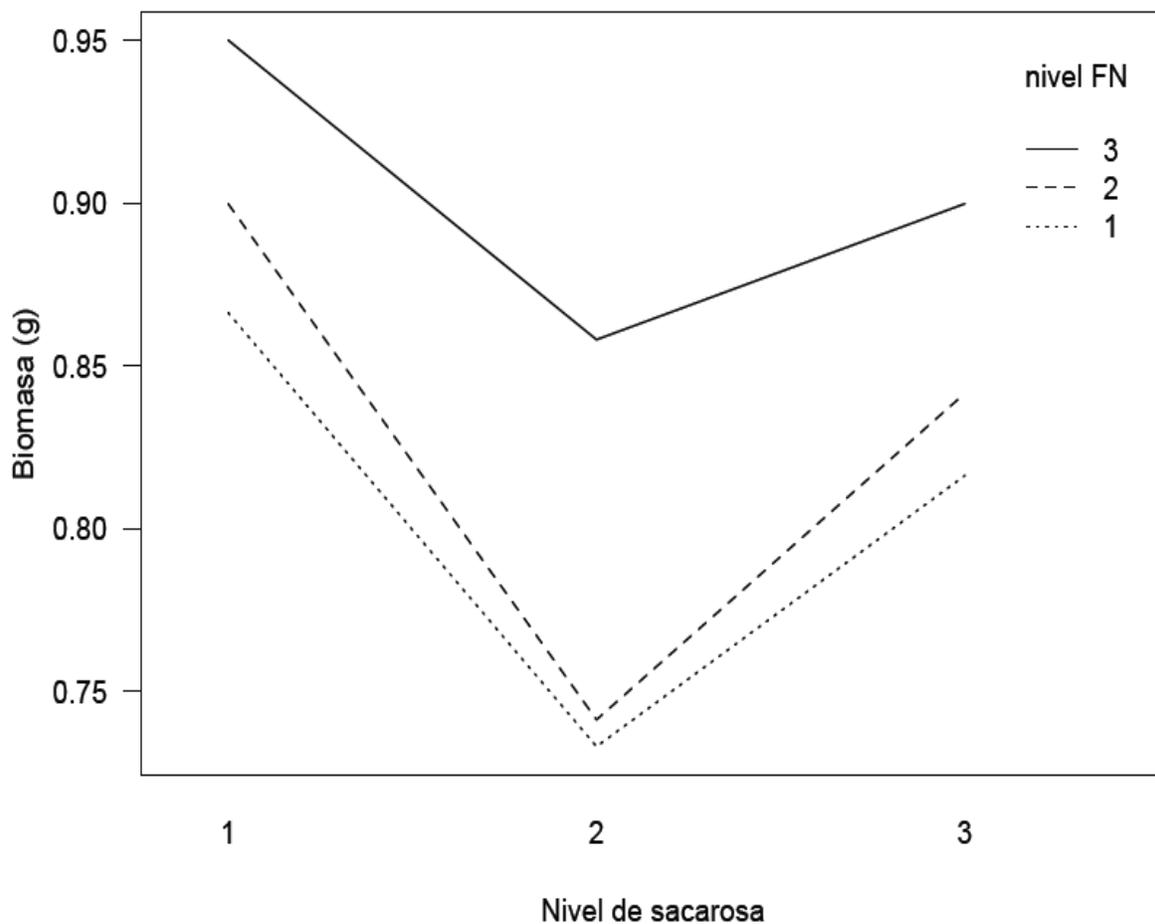


Ilustración 4 Interacción de la sacarosa con el nitrato de amonio (f)

Los resultados muestran mucha desviación por tanto fue necesario repetir el ensayo.

ENSAYO 2

Las concentraciones para los siguientes ensayos estuvieron basadas en estos resultados, tomando como referencia que a concentraciones más bajas de sacarosa se obtienen mejores resultados, mientras que para el nitrato de amonio (f) las concentraciones altas dan mejores resultados, por lo tanto se probaron las siguientes:

Tabla 10 Modelo del experimento en base a concentraciones altas, medias y bajas de la fuente de carbono y nitrógeno.

Ingrediente	Concentración alta (g/L)	Concentración media (g/L)	Concentración baja (g/L)
Sacarosa	70	50	30
Nitrato de amonio (f)	3.4	2.5	1.7

* (f) grado fertilizante

*Tabla 11 Análisis de varianza efecto del efecto de los niveles de sacarosa y nitrato de amonio (f) sobre las Log UFC (logUFC~sacarosa*fosfonitrato)*

	GL	SC	CM	Valor de F	Pr (>F)
Sacarosa	1	0.593	0.5934	3.088	0.0864
Nitrato de amonio (f)	1	0.248	0.2475	1.288	0.2630
Interacción	1	0.182	0.1819	0.946	0.3363
Residuales	41	7.881	0.1922		

* (f) grado fertilizante

*Tabla 12 Análisis de varianza del efecto de los niveles de sacarosa y nitrato de amonio (f) sobre la biomasa (biomasa~sacarosa*fosfonitrato)*

	GL	SC	CM	Valor de F	Pr (>F)
Sacarosa	1	0.00675	0.006750	3075.0	<2e-16 ***
Nitrato de amonio (f)	1	0.00075	0.000750	341.7	<2e-16 ***
Interacción	1	0.00000	0.000000	0.0	1
Residuales	41	0.00009	0.000002		

* (f) grado fertilizante

El ANOVA muestra diferencia no significativa sobre Log UFC/mL, mientras que para la biomasa muestra diferencias significativas muy altas (tabla 11 y 12).

No se encuentra una tendencia de los tratamientos, pero se puede observar en la biomasa, que las cantidades son más bajas con respecto al ensayo anterior. A concentraciones altas de sacarosa se encuentran los mejores resultados, sin tomar en cuenta la interacción con la fuente de nitrógeno (Ilustración 6).

El tratamiento con mayor crecimiento fue el compuesto por sacarosa alta y nitrato de amonio (f) bajo con una media de 13.44 Log UFC/mL, seguido por el medio de sacarosa alta y nitrato de amonio (f) alta. Mientras que el medio que presentó menor crecimiento fue el de sacarosa media y nitrato de amonio (f) medio con 12.56 Log UFC/mL (Ilustración 5).

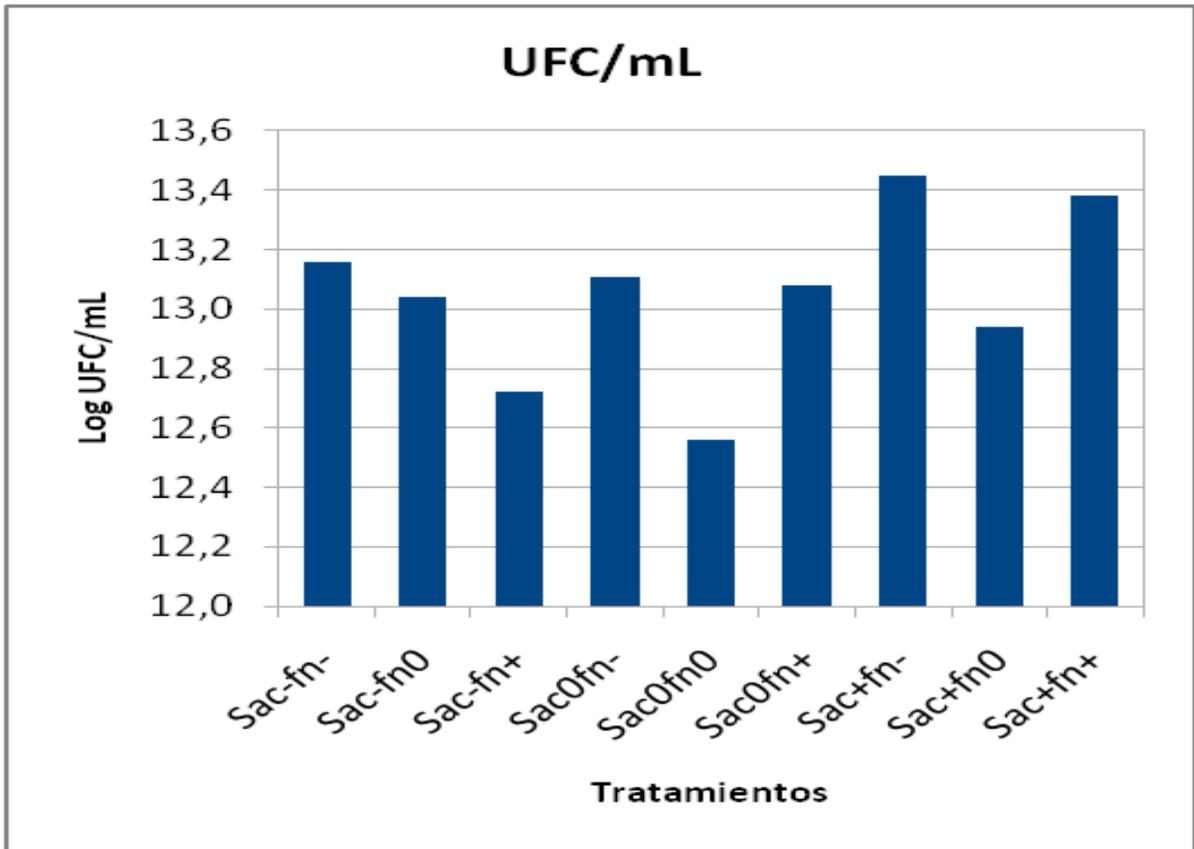


Ilustración 5 Comportamiento de los tratamientos respecto a la variable UFC/mL en el ensayo 2

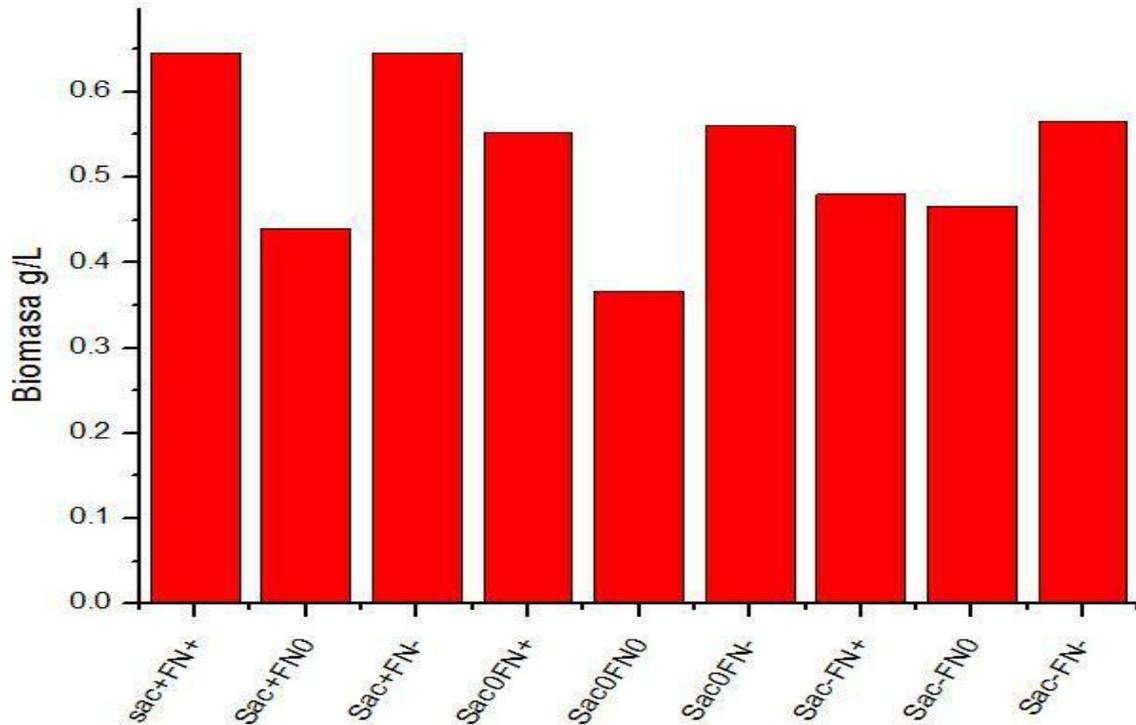


Ilustración 6 Comportamiento de los tratamientos respecto a la variable biomasa g/L en el ensayo 2.

Simbología: sac(sacarosa), fn (nitrato de amonio (f)), (+) nivel alto, (0) nivel medio y (-) nivel bajo.

Se repitió el ensayo por duplicado, con las mismas concentraciones, encontrándose problemas de precipitación, lo cual se adjudicó al nitrato de amonio por ser de grado fertilizante, por tanto se optó por sintetizarlo en un mayor grado de pureza en el laboratorio. Ahora siendo de un mayor grado de pureza se usó en los siguientes ensayos para comprobar resultados de los pasados.

ENSAYO 3

El ensayo anterior se retomó con las mismas concentraciones para la fuente de carbono y nitrógeno, así como en los anteriores.

Tabla 13 Modelo del experimento en base a concentraciones altas, medias y bajas de la fuente de carbono y nitrógeno.

Ingrediente	Concentración alta (g/L)	Concentración media (g/L)	Concentración baja (g/L)
Sacarosa	70	50	30
Nitrato de amonio (r)	3.4	2.5	1.7

*(r) grado reactivo

*Tabla 14 Análisis de varianza efecto del efecto de los niveles de sacarosa y nitrato de amonio (f) sobre las Log UFC (logUFC~sacarosa*fosfonitrato)*

	GL	SC	CM	Valor de F	Pr (>F)
Sacarosa	1	5.92	5.921	1.493	0.229
Nitrato de amonio	1	0.36	0.358	0.090	0.766
Interacción	1	0.75	0.746	0.188	0.667
Residuales	41	162.63	3.967		

*(r) grado reactivo

*Tabla 15 Análisis de varianza del efecto de los niveles de sacarosa y nitrato de amonio (f) sobre la biomasa (biomasa~sacarosa*fosfonitrato)*

	GL	SC	CM	Valor de F	Pr (>F)
Sacarosa	1	0.001	0.0013	0.016	0.9014
Nitrato de amonio	1	0.465	0.4645	5.366	0.0256 *
Interacción	1	0.000	0.0001	0.001	0.9801
Residuales	41	3.549	0.0866		

*(r) grado reactivo

Para la variable Log UFC/mL el ANOVA no muestra diferencias significativas, pero si para biomasa (tabla 13 y 14). Aunque numéricamente, los medios con mayor crecimiento fue el compuesto por sacarosa media y nitrato de amonio alto, con la misma cantidad el medio de sacarosa baja con nitrato de amonio alto con 14 Log UFC/mL, mientras que el de menor crecimiento fue el de sacarosa baja con nitrato de amonio medio, con 12.99 Log UFC/mL. En la ilustración 7, se puede observar que los tratamientos con niveles bajos de sacarosa tienen un comportamiento más uniforme, lo cual también se observa en la gráfica de biomasa, mostrándose claramente que el mejor de los tratamientos es el compuesto por sacarosa baja y nitrato de amonio bajo (Ilustración 8 y 9). Cabe mencionar que los mejores tratamientos son los que conllevan niveles bajos de nitrato de amonio, y sucede lo contrario con los niveles altos de este mismo.

Se realizó la repetición de este ensayo con las mismas concentraciones para corroborar los datos, ya que no se muestra una tendencia certera de cada uno de los medios.

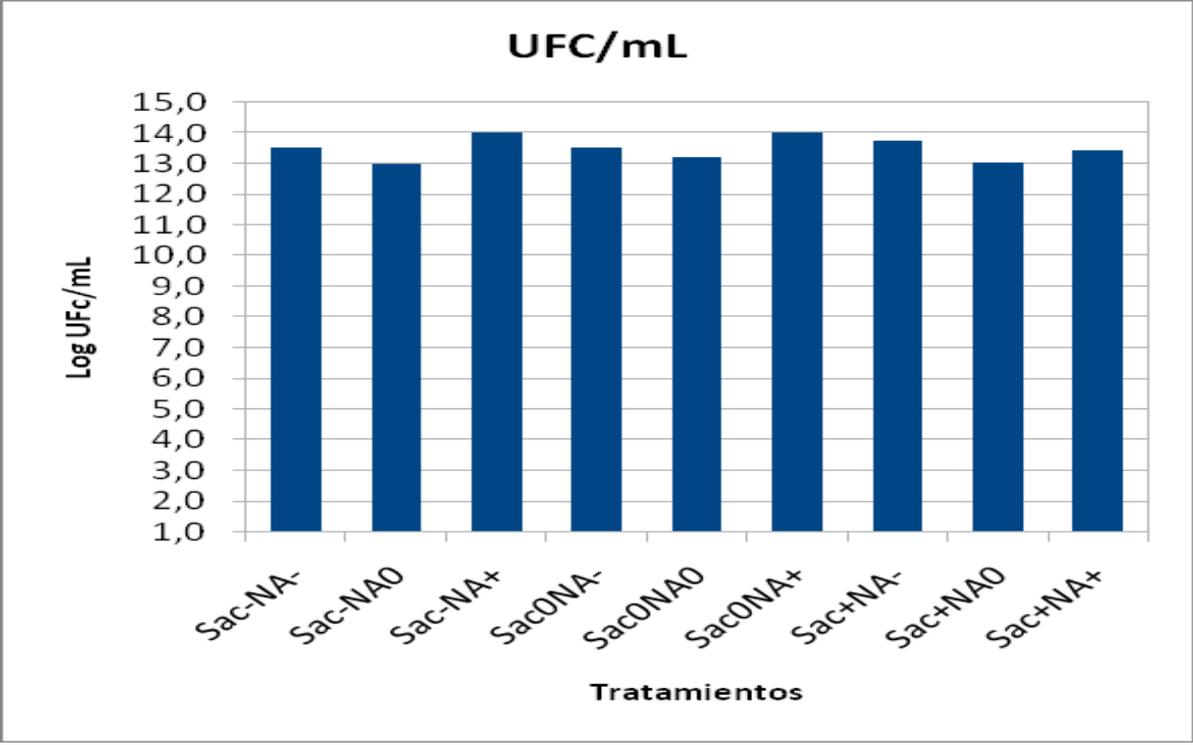


Ilustración 7 Comportamiento de los tratamientos respecto a la variable UFC/mL en el ensayo 3.

Simbología: sac(sacarosa). fn (nitrato de amonio (r)). (+) nivel alto. (0) nivel medio v (-) nivel bajo.

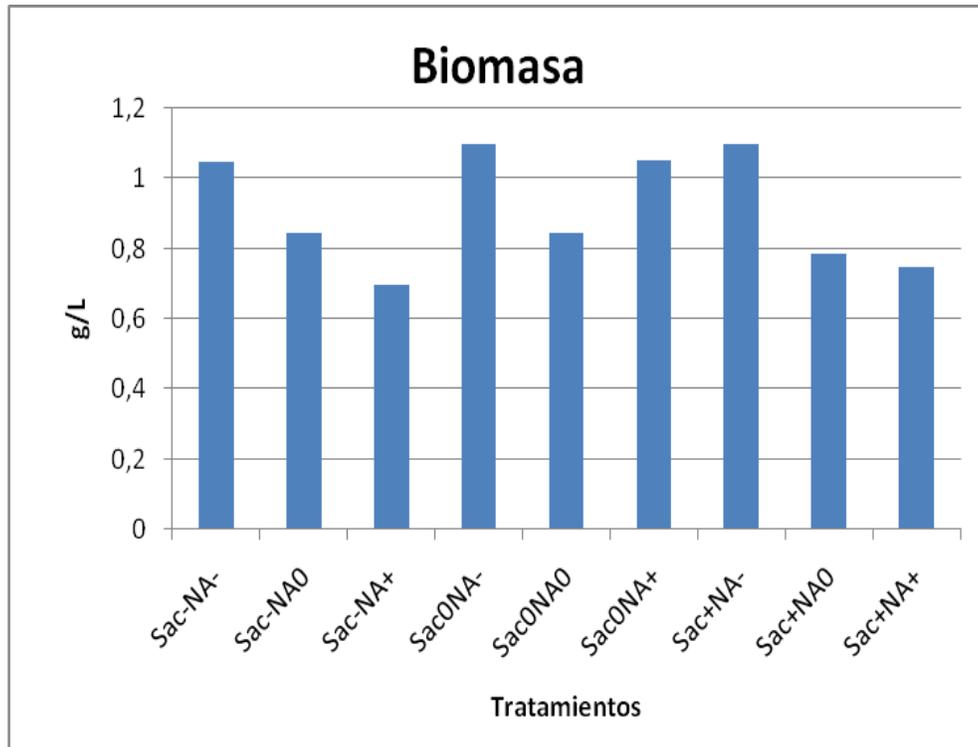


Ilustración 8 Comportamiento de los tratamientos respecto a la variable biomasa g/L en el ensayo 3

.Simbología: sac(sacarosa), fn (nitrato de amonio (r)), (+) nivel alto, (0) nivel medio y (-) nivel bajo

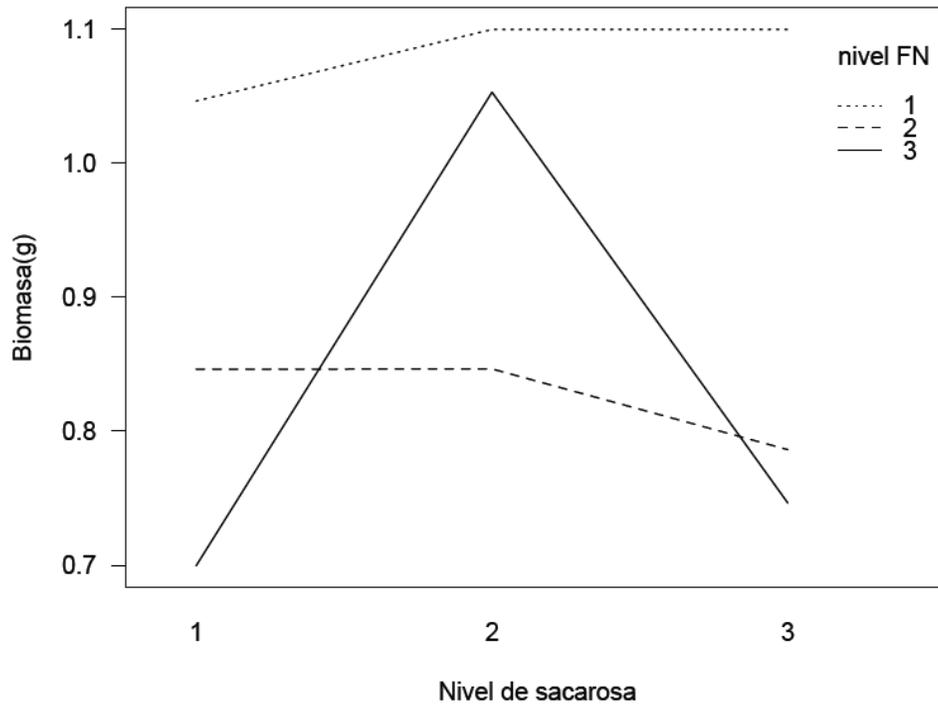


Ilustración 9 Interacción de la fuente de sacarosa con el nitrato de amonio, ensayo 3.

ENSAYO 4

Repetición del anterior.

Tabla 16 Modelo del experimento en base a concentraciones altas, medias y bajas de la fuente de carbono y nitrógeno.

Ingrediente	Concentración alta (g/L)	Concentración media (g/L)	Concentración baja (g/L)
Sacarosa	70	50	30
Nitrato de amonio (r)	3.4	2.5	1.7

*(r) grado reactivo

*Tabla 17 Análisis de varianza efecto del efecto de los niveles de sacarosa y nitrato de amonio (f) sobre las Log UFC (logUFC~sacarosa*fosfonitrato)*

	GL	SC	CM	Valor de F	Pr (>F)
Sacarosa	1	0.002	0.0022	0.008	0.929
Nitrato de amonio (r)1	1	0.193	0.1925	0.690	0.411
Interacción	1	0.490	0.4898	1.757	0.193
Residuales	40	11.155	0.2789		

*(r) grado reactivo

*Tabla 18 Análisis de varianza del efecto de los niveles de sacarosa y nitrato de amonio (f) sobre la biomasa (biomasa~sacarosa*fosfonitrato)*

	GL	SC	CM	Valor de F	Pr (>F)
Sacarosa	1	0.0009	0.0009	0.040	0.843
Nitrato de amonio (r)1	1	1.5382	1.5382	65.656	5.74e-10 ***
Interacción	1	0.0536	0.0536	2.286	0.138
Residuales	40	0.9371	0.0234		

*(r) grado reactivo

El ANOVA para la variable Log UFC/mL no muestra diferencias estadísticas significativas (tabla 17). Sin embargo, numéricamente el medio de sacarosa alta con nitrato de amonio bajo fue el de mayor crecimiento con 13.79 Log UFC/mL, y el de menor crecimiento fue la combinación de concentraciones altas con 13.11 Log UFC/mL.

El análisis de varianza para biomasa muestra un efecto altamente significativo del nitrato de amonio sobre los tratamientos (tabla18). La mayor producción de biomasa se alcanza con la combinación de concentraciones bajas de nitrato de amonio con los diferentes niveles de sacarosa, lo cual es parecido a lo obtenido en el ensayo anterior (3) obteniéndose 1.440 g/L, mientras que la menor producción estuvo dada en la combinación de sacarosa media y nitrato de amonio alto con 0.786 g/L.

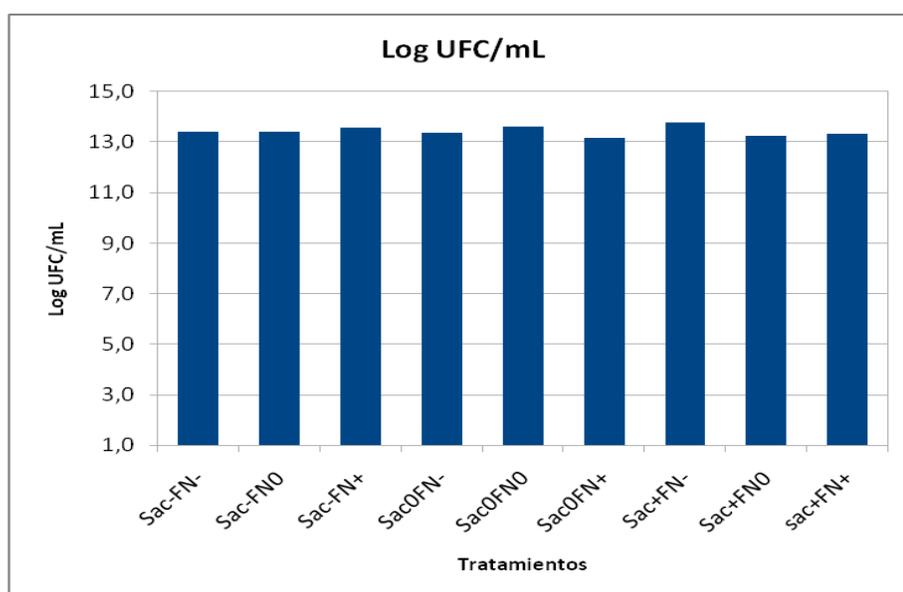


Ilustración 10. Comportamiento de los tratamientos respecto a la variable UFC/mL en el ensayo 4.

Simbología: sac(sacarosa), fn (nitrato de amonio (r)), (+) nivel alto, (0) nivel medio y (-) nivel bajo

Con los resultados obtenidos se eligió el medio compuesto por las concentraciones bajas de sacarosa y nitrato de amonio, ya que dio los mejores resultados para biomasa, la variable de mayor interés en el estudio, para la posible elaboración de un biofertilizante a partir de este medio de cultivo.

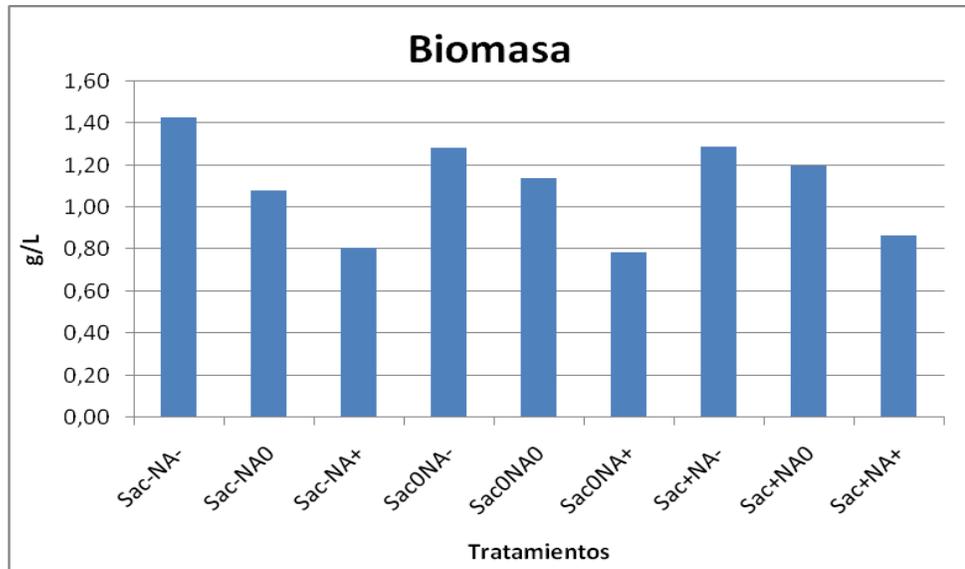


Ilustración 11. Comportamiento de los tratamientos respecto a la variable biomasa g/L en el ensayo 4.

Simbología: sac(sacarosa), fn (nitrato de amonio (r)), (+) nivel alto, (0) nivel medio y (-) nivel bajo.

Además de ser fuentes de carbono y nitrógeno con fácil accesibilidad y un costo económico bajo. Lo cual es parecido a lo obtenido por Rojas y Moreno (2008), evaluaron la optimización de un medio de cultivo en el cuál evaluaron 25, 30 y 35 g/L de sacarosa y 2, 3 y 4 g/L de nitrato de amonio. Los resultados obtenidos, revelaron que a 4 g/L de nitrato de amonio el crecimiento se estanca muy rápido, lo que sugiere que esta cantidad es una concentración muy alta para el microorganismo originando inhibición de crecimiento o muerte. Las combinaciones 25/2 y 30/2 son las que resultaron en mayor concentración de biomasa, el medio seleccionado fue el de 25

g/L de sacarosa y 2 g/L de nitrato de amonio. Además de ser una fuente de fácil accesibilidad y de menor costo.

Rojas *et al*, (2009) estandarizaron un medio de cultivo para *Rhizobium*, el cual estaba compuesto de glicerol, sacarosa, melaza, glutamato, extracto de levadura, extracto de soya y NH₄Cl, utilizando una relación carbono/nitrógeno de 42/1 para sacarosa, con lo cual no obtuvieron buenos resultados descartándolo como una buena fuente para el crecimiento de rizobios, la causa se atribuye a que los fuentes usadas en los medios a evaluar contenían compuestos complementarios, con lo cual ofrecían mejores características para el desarrollo de los rizobios.

Bjasaet *al*, (2005) seleccionaron un medio (M2G), con glicerol como fuente de carbono y extracto de malta y de levadura como fuente de nitrógeno, como el más adecuado para la producción de biomasa bacteriana a escala industrial.

Cepeda (2008) evaluó un biofertilizante obtenido a través de bacterias solubilizadoras de fósforo, para lo cual tuvo que identificar un buen medio de cultivo más económico para reproducirlas; uso un medio de cultivo a base de jugo de caña, el cual contiene una cantidad de carbohidratos totales de 151.9, sodio 0.032, potasio 0.35, proteínas 0.4, magnesio 0.92 y calcio 0.05 (todo en g/L) y compararlo con un medio ya establecido Pikovskaya (con 10 g/L de glucosa como fuente de carbono y 3.5 g/L de extracto de levadura como fuente de nitrógeno). También se compara el efecto de un medio a base de la combinación de los anteriores. Los resultados obtenidos muestran que todos los medios cumplen las necesidades metabólicas de las bacterias y los requisitos para producir un biofertilizante, ya que el crecimiento bacteriano estuvo por encima de 10⁸ UFC/mL. El medio comercial ya establecido fue superior a los dos restantes con un crecimiento superior a 10¹² UFC/mL. El medio Pikosvkaya cuenta con una relación C/N 30:2. Angulo (2008), diseño un medio de cultivo a partir de fuentes nutricionales económicas para la producción de un inoculante de bacteria solubilizadoras de fósforo, cuya formulación fue: levadura 2.5 g/L, roca fosfórica 10 g/L y sacarosa 15 g/L, obteniéndose con esta concentración de nutrientes la mayor producción de biomasa (11.8 Log UFC/mL).

VIII. Conclusiones

El uso de fuentes alternativas como fuente de carbono y nitrógeno como componentes de un medio de cultivo para bacterias solubilizadoras de fósforo disminuye costos en su producción, además de cumplir las necesidades metabólicas del microorganismo de interés. En la presente investigación se encontró que el uso de niveles bajos de sacarosa (30 g/L), en combinación con el nitrato de amonio en grado reactivo en concentraciones bajas (1.7 g/L), proporciona buenos rendimientos de biomasa. Se alcanzó una producción de 1.439 g/L, lo cual ya es una cantidad aceptable en la producción de biofertilizantes.

El medio fue apto para el crecimiento de cepas de bacterias solubilizadoras de fósforo, ya que cubrió sus necesidades metabólicas, mantuvo y replicó la población celular. Por tanto, el medio representa de manera comprobada una opción para disminuir los costos de producción de un inoculante bacteriano.

IX. Recomendaciones

- Realizar más pruebas de crecimiento de las demás cepas que se tienen en el laboratorio y evaluar su viabilidad para cada una de ellas, revisando así el funcionamiento del medio para todas estas cepas de bacterias solubilizadoras de fósforo.
- Realizar el escalamiento del medio de cultivo al fermentador de 3 litros y controlar los factores de crecimiento de las bacterias, pH, Oxígeno disuelto y temperatura, pudiéndose esperar que las concentraciones de UFC/mL y Biomasa aumenten, ya con las condiciones controladas.
- Probar la sobrevivencia de las cepas en campo.

X. Literatura citada

- Arias, P. C. A. M., R. I. Garcia C., J. Villegas C., A. De Leonardo., M. Morales., y M. A. Trujillo R. 2011. Evaluación del crecimiento de una cepa de *R. Etli* utilizada como biofertilizante, en cultivos a nivel matraz y biorreactor, bajo distintas condiciones nutrimentales y de operación. XIV Congreso Nacional de biotecnología y bioingeniería. . Queretaro, Qro. 19 a 24 de junio, 2001.
- Cepeda, M. Ma. V. 2008. Prueba a nivel de invernadero y determinación de la sobrevivencia de un biofertilizante producido a partir de bacterias solubilizadoras de fósforo utilizando un medio de cultivo alternativo. Tesis para la obtención de grado académico o título de Ingeniero en Biotecnología. Escuela Politécnica del Ejército. Sangolqui. 142 p.
- Angulo, C. J. P., García, D. A., Marina, P. A., Martínez, S. M. M y Gutiérrez, R. V. 2012. Diseño de un medio de cultivo para la producción de un co-cultivo de bacterias fosfato solubilizadoras con Jactividade fosfatasa. Javeriana. 17:1. 43-52.
- Acuña, O. 2003. <http://cep.unep.org/repcar.png/capacitacion-y-concienciacion/cenat/biofertilizantes.pdf>.
- Adams, M R. y M. O. Moss. 1995. Microbiología de los alimentos. Primera edición. Editorial Acribia S. A. España. 23-55 Pp.
- Afif, K. E. 2005. Dinámica del fósforo en suelos cálcicos de áreas Mediterraneas. Ediciones de la Universidad de Oviedo Servicio de Publicaciones de la U. O. Campus de Humanidades. Edificio de servicios 33011 aviedo. 91p.
- Aguirre, M. J. F. 2004. Biofertilizantes microbianos: Antecedentes del programa y resultados de validación en México. En: Simposio de Biofertilización realizado el 25 de noviembre 2004, Rio Bravo, Tam., México. Memorias: 127p.

- Alexander, M. 1987. *Introducing of soil microbiology*. New York Ed. Willey ads Sons. 83-88.
- Arroyo, G. 1989. El desarrollo de la biotecnología: desafíos para la agricultura y la agroindustria. Universidad Veracruzana, IIESES. Vol. 24. 69-96 Pp.
- Becerra, J. M., D. Quintero., M. Martínez y A. Matiz. 2011. Caracterización de microorganismos solubilizadores de fosfato aislados de suelos destinados al cultivo de uchuva (*Physalis peruviana* L.). *Revista colombiana de ciencias hortícolas* 5:2. Bogotá, Colombia. 1-14 Pp.
- Bernal, G., A. Illanes y L. Ciampi. 2002. Isolation and partial purification of a metabolite from a mutant strain of *Bacillus* sp. with antibiotic activity against plant pathogenic agents. *EJB Electronic Journal of Biotechnology*. 5:1. Chile. 9 p.
- Bryan, A. H., Ch. A. Bryan., y Ch. G. Bryan. 1971. *Bacteriología: principios y prácticas*. Primera edición. Continental S. A. México. 153-155.
- Cepeda, M. Ma. V. 2008. Prueba a nivel de invernadero y determinación de la sobrevivencia de un biofertilizante producido a partir de bacterias solubilizadoras de fósforo utilizando un medio de cultivo alternativo. Tesis previa a la obtención de grado académico o título de Ingeniera en Biotecnología. Ecuador. 142 p.
- Cruz, M. L. C. 2007. Estandarización del proceso de producción masiva del hongo *Trichoderma koningii* Th003 mediante fermentación bifásica a escala piloto. Tesis grado de Microbiologa Industrial. Pontifica Universidad Javeriana. Facultad de Ciencias. Carrera de Microbiología Industrial, Bogotá, D. C. 63-71.
- Echeverría de la Bastida, María Cristina (2007). Producción de biofertilizante a partir de cepas autóctonas de *Azotobacter* SPP mediante fermentación discontinua en caldo pikovskaya modificado y caldo alternativo a escala de diez litros. Facultad de Ingeniería en Biotecnología. ESPE. Sede Sangolquí. <http://repositorio.espe.edu.ec/handle/21000/1214>.
- Fernández, L. A., P. Zalba., M. A. Gómez. y M. A. Sagardoy. 2005. Bacterias solubilizadoras de fosfato inorgánico aisladas de suelos de la región sojera. *Cl. Suelo*. Argentina. 23:1. 7p.

- Frioni, L. 1999. Procesos microbianos. Editorial de la fundación Universidad Nacional de Río Cuarto. Argentina. 332p.
- Guerrero, A. 1990. El suelo, los abonos y la fertilización de los cultivos. Ed. Mundi-Prensa. México. 53p.
- Jeffries, P., S. Gianinazzi, S. Perotto, K. Turnau, y J. M. Barea. 2003. The contribution of arbuscularmycorrhizal fungi in sustainable maintenance of plant health and soil fertility. *Biol. Fertil. Soils* 37:1-16p.
- Lizardi, J. M. A. 2011. Contribución al estudio de la hidrodinámica y transferencia simultánea de masa en biorreactores airlift de tres fases: producción de un consorcio microbiano degradador de petróleo. Tesis para obtener el grado de Doctor en Biotecnología. Universidad Autónoma Metropolitana. Iztapalapa, D. F. 1pp.
- López, R. G. F. 1992. Microbiología agrícola. Apoyos académicos Num. 18. Universidad Autónoma Chapingo. México. 16-62.
- Mantilla, C. L. 2005. Evaluación de biomasa ruminal en el medio de guayaba agria. *Arch. Zootec.* 54:109-112. Colombia. 4p.
- Morales, L. E. 2008. Cultivos celulares de *Jacaratia mexicana* en tres tipos de biorreactores para la producción de enzimas proteolíticas. Tesis grado de maestría en ciencias en bioprocesos. Instituto Politécnico Nacional. México, D. F. 69p.
- Olalde, P. V., y R. Serratos. 2004. Biofertilizantes: Micorrizas y bacterias promotoras de crecimiento. En: Simposio de Biofertilización realizado el 25 de noviembre 2004, Rio Bravo, Tam., México. Memorias: 38-41p.
- Paredes, M. M. 2010. Aislamiento y caracterización bioquímica de metabolitos producidos por rizobacterias que solubilizan fosfato. Tesis presentada como requisito parcial para obtener el grado de: Doctora en Ciencias. México. 140p.
- Peña, H. B. y I. Reyes. 2007. Aislamiento y evaluación de bacterias fijadoras de nitrógeno y disolventes de fosfatos en la promoción del crecimiento de la lechuga (*Lactuca sativa* L.). *Interciencia.* 32:8. Caracas, Venezuela. 7p.
- Quintero, R. 1981. Bioingeniería. Primera edición. Editorial Alhambra Mexicana, S. A. México.

- Rivera, C. Ma. C., A. Trujillo. N., y D. E. Alejo. P. 2010. Los biofertilizantes integrados con bacterias fijadoras de nitrógeno, solubilizadoras de P y sustratos orgánicos en el crecimiento de naranjo agrio *Citrus aurantium* L. *Interciencia* 35:2. Venezuela. Pp. 115.
- Rivera, B.D.M. 2008. Optimización de un medio de cultivo para la producción de un inoculante con base en *Azospirillum brasilense* C16. Tesis para obtener el grado de Ingeniero de producción biotecnológica. Universidad Francisco De Paula Santander. Facultad de Ciencias Agrarias y del Ambiente. Plan de Estudios de Ingeniería de Producción Biotecnológica. San José de Cucuta. 92pp.
- Rojas S. J. y N. Moreno S. 2008. Producción y formulación de prototipos de un biofertilizante a partir de bacterias nativas asociadas al cultivo de arroz (*Oryza sativa*). *Rev. Colomb. Biotecnol.* 10:2. Colombia. Pp. 50-62.
- Rose, H. A. 1969. *Microbiología química*. Segunda edición. EXEDRA. Butterworth, Londres. Pp. 53-59.
- Soler, G. A. P. 2009. Evaluación de un sistema de aireación externo en la fermentación con *Lactococcus lactis*. Tesis grado Magister en Ingeniería Química. Universidad Nacional de Colombia. Facultad de Ingeniería. Departamento de Ingeniería Química, Bogotá, D. C. 12-29.
- Soria, F. M, R. Ferrera-Cerrato, J. Etchevers B., G. Alcántar G., J. Trinidad S., L. Borges G. y G. Pereyda P. 2001. Producción de biofertilizantes mediante biodigestión de excreta líquida de cerdo. *Terra Latinoamericana*. 19:004. Universidad Autónoma Chapingo, Mexico. Pp. 353 – 362.
- Terry, A. E., A. Leyva y A. Hernández. 2005. Microorganismos benéficos como biofertilizantes eficientes para el cultivo del tomate (*Lycopersicon esculentum*, Mill). *Rev. Colomb. Biotecnol.* 7:2. Colombia. Pp. 47-54.
- Teuscher, H., Adler R., Seaton, J. P. 1965. *El suelo y su fertilidad*. Compañía editorial continental, S. A. 249p.
- Todar, K. 2002. Nutrition and growth of bacteria. Disponible en: <<http://www.bact.wisc.edu/Bact303/NutritionandGrowth>>.
- Torriente, D. 2010. Aplicación de bacterias promotoras del crecimiento vegetal en el

- cultivo de la caña de azúcar. Perspectivas de su uso en Cuba. Cultivos Tropicales. Cuba. 31:1. 8p.
- Tortora, G. J., B. R. Funke., y C. L. 2007. Case. Introducción a la micología. 9a Edición. Editorial médica Panamericana. Buenos Aires, México. 120-172.
- Treto, E., M. García., R. Martínez. V., y J. M. Febles. 2005. Avances en el manejo de los suelos y la nutrición orgánica. DESAL. Cuba. 1-23p.
- Willey, J. M., L. M. Sherwood., y Ch. J. Woolvertoon. 2009. Microbiología de Prescott, Harley y Klein. Séptima edición. Mc Graw Hill. Madrid, Bogota, Buenos Aires, Caracas, Guatemala, México. 101-119

X. ANEXOS

Calculo de concentración de los ingredientes del medio de cultivo

Se realizó el cálculo de las concentraciones de cada uno de los elementos necesarios para que una bacteria se desarrolle. Se estableció como meta alcanzar 20 g/L peso seco de biomasa con una relación C/N, 25/2 y 30/2 (Rojas y Moreno, 2008). Tomando en cuenta que la composición de una bacteria es la siguiente:

Elemento	% Obtenida con carbohidratos
C	45.6
H	7.6
O	30.2
N	12.1
CENIZAS	5.5

Cuadro 1. Fuentes de carbono usadas en la investigación y su rendimiento

Elemento	Rendimiento (Y)
Fructosa	Ys =0.4
Sacarosa	Ys = 0.25 (Melaza)
Lactosa	Ys= 0.5 (Suero de leche para <i>S. fragilis</i>)
Malato	Ys = 0.36

Cuadro 2. Rendimientos para *E. coli* y *K. Aerogenes*

	<i>E. coli</i>	<i>K. aerogenes</i>
Yc =	0.5	1
YP =	50	39
Ys =	100	333
YN =	10	8.75
YMg =	200	430
YK =	100	59

Cálculo de los componentes del medio de cultivo

Se tomaron los rendimientos para *E. Coli*: $Y_C = 0.5$, $Y_P = 50$, $Y_N = 10$, $Y_{Mg} = 100$ y 430 (Quintero, 1981), $Y_S = 100$ y $Y_K = 100$ (expresados en la tabla 1 y 2); se determinó los g/L de cada elemento para el medio de cultivo usando como ejemplo la sacarosa y determinar la cantidad a utilizar a partir de la siguiente fórmula:

Sacarosa
 $Y_C = 0.25$, por tanto, $Y_C = \text{g células/g de sustrato ?}$,
 entonces, $\text{g de sustrato} = \text{g de células} / Y_C$; de lo cual podemos obtener: $\text{g de sustrato} = 20\text{g} / 0.4$; de lo cual se obtuvo, $\text{g sustrato} = 80 \text{ g/L}$.

$\text{g de sustrato} = \text{g de células} / Y_C$, esta es la fórmula usada para obtener los gramos de sustrato de cada elemento.

De lo cual se obtuvo:

Cuadro 3. Concentraciones de los distintos elementos que compondrán el medio de cultivo

Elemento	Gramos de sustrato/L
Jarabe fructosado	107.14 *
Lactosa	40 *
Sacarosa	80 *
Nitrógeno	2
Azufre	0.2
Fósforo	0.4
Magnesio	0.1 y 0.043 (Quintero, 1981)
Potasio	0.2

* Concentraciones ya definidas, los elementos restantes serán agregados en un compuesto, del cual aún se desconoce la cantidad.

Los siguientes elementos son necesarios en el medio, en cierto porcentaje tomados de lo reportado en Libro de bioingeniería de Quintero, 1981, pag. 28.

Azufre	Fósforo	Magnesio	Nitrógeno
20 g/L = 20 %	20g/L = 100%	20 g/L = 100%	20 g/L = 100%
x = 1%	x = 3%	x = 0.5%	x = 14%
x = 0.2 g/L de S	x = 0.6 g/L de P	x = 0.1 g/L de Mg	x = 2.8 g/L de N

Ahora es necesario saber cuánto agregar de cada elemento de las sales y el valor estará dado de acuerdo al compuesto que apliquemos y el porcentaje que contiene de cada elemento.

- Magnesio $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O} = 246.9 \text{ g/Mol}$
 $\text{Mg} = 24.3 \cdot 1 = 24.3 = 9.84 \%$
 $\text{S} = 32.06 \cdot 1 = 32.06 = 12.98 \%$
 $\text{O} = 16 \cdot 11 = 176 = 71.28 \%$
 $\text{H} = 1 \cdot 14 = 14 = 5.67 \%$

0.1g de Mg = 9.86%
 $x = 100\%$
 $x = 1.01 \text{ g de MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O/L}$

0.043 g de Mg = 9.86 %
 $x = 100\%$
 $x = 0.44 \text{ g de MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O/L}$

- Azufre = 0.2 g/L
 $0.44 = 100\%$
 $x = 12.98$
 $x = 0.06 \text{ g de azufre en } 0.44 \text{ g de MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, aún es necesario 0.14 g de azufre.

$\text{KH}_2\text{SO}_4 = 137.02$
 $\text{K} = 39 \cdot 1 = 39 = 28.46 \%$
 $\text{H} = 1.008 \cdot 2 = 2.016 = 1.47 \%$
 $\text{S} = 32 \cdot 1 = 32 = 23.35 \%$
 $\text{O} = 16 \cdot 4 = 64 = 46.71 \%$

0.14 g = 23.54 %
 $x = 100 \%$
 $x = 0.59 \text{ g de KH}_2\text{SO}_4/\text{L}$

$*(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4 = 132.14 \text{ g/mol}$
 $\text{N} = 14.006 \cdot 2 = 28.012 = 21.2 \%$
 $\text{H} = 1.007 \cdot 8 = 8.06 = 6.1 \%$
 $\text{S} = 32.064 \cdot 1 = 32.064 = 24.26 \%$
 $\text{O} = 16 \cdot 4 = 64 = 49.43 \%$

$Y_s = 100$
 $\text{gr de sustrato} = \text{gr de células} / Y_s$
 $\text{gr de sustrato} = 20 / 100$
 $\text{gr de sustrato} = 0.2 \text{ gr/L}$

0.14 g = 24.26%
 $x = 100\%$
 $x = 0.58 \text{ g de } (\text{NH}_4)_2\text{SO}_4/\text{L}$

También es necesario hacer una amortiguación de pH del medio de cultivo; se

realizaron los cálculos y obtener el valor de cuanto base debemos de agregar para un pH de 7.0.

$pH = pKa - \log(HA/A)$, de lo cual se desconoce la cantidad de sal que debemos agregar.

Sustituyendo:

$$7.0 = 7.21 - \log((2.24 \text{ g/L})/(A))$$

$$-0.21 = -\log((2.24 \text{ g/L})/(A))$$

$$10^{-0.21} = (2.24 \text{ g/L})/(A)$$

$$1.62 (A) = 2.24 \text{ g/L}$$

$$A = (2.24 \text{ g/L})/(1.62)$$

$$A = 1.38 \text{ g/L de } K_2HPO_4$$

Cuadro 4. Concentraciones de las sales, componentes del medio

Reactivo	g/L
MgSO ₄ *7H ₂ O	0.44
(NH ₄) ₂ SO ₄	0.58
KH ₂ PO ₄	3.5
K ₂ HPO ₄	2.15
Microelementos	1 ml (tomado de la literatura)

Las cantidades de KH₂PO₄ y K₂HPO₄ fueron tomadas de la literatura revisada, para amortiguar el pH.

También es necesario obtener el peso óptimo de las fuentes de nitrógeno.

Fosfonitrato, el cual tiene nitrógeno en forma de Amonio y nitrato.

90% NH₄NO₃, por tanto, 16.5 % N(NH₄⁺) + 16.5 % N(NO₃⁻) = 33 % y un 3% de P₂O₅.

En el medio debe haber siempre una relación C/N = 30/2, en base a esta proporción es necesario obtener el peso del nitrógeno combinado con las distintas fuentes de C.

80 g de sacarosa

$$80 = 30$$

$$x = 2$$

$$x = 5.33 \text{ g de N}$$

50 g de fructosa

$$50 = 30$$

$$x = 2$$

$$x = 3.33 \text{ g de N}$$

40 g de lactosa

$$40 = 30$$

$$x = 2$$

$$x = 2.67$$

Resultado de los ensayos, tabla de medias

ENSAYO 1

Cuadro 5. Resultados cuenta viable

Sacarosa	Nitrato de amonio (f)	Media de Log UFC/mL	Media pH	Media biomasa g/L
80	2.20	13.1	3.45	0.899
80	2	13.72	3.51	0.841
80	1.8	13.08	3.56	0.816
70	2.20	13.04	3.55	0.858
70	2	12.68	3.63	0.741
70	1.8	12.70	3.56	0.733
60	2.20	13.43	3.33	0.950
60	2	13.39	3.34	0.899
60	1.8	13.07	3.42	0.866

ENSAYO 2

Cuadro 6. Resultados de cuenta viable

Sacarosa	Nitrato de amonio (f)	Media de Log UFC/mL	Media pH	Media biomasa g/L
70	3.4	13.38	3.94	0.702
70	2.5	12.93	3.74	0.707
70	1.7	13.44	3.74	0.712
50	3.4	13.07	3.73	0.717
50	2.5	12.56	3.80	0.722
50	1.7	13.11	3.84	0.727
30	3.4	12.71	3.96	0.732
30	2.5	13.03	3.87	0.737
30	1.7	13.16	3.75	0.742

ENSAYO 3 y 4

Cuadro 7. Tabla de medias de los ensayos 6 y 7

Concentraciones de carbono y nitrógeno		Ensayo 3	Ensayo 4	Ensayo 3	Ensayo 4	Ensayo 3	Ensayo 4
Sacarosa	Nitrato de amonio	Media Log UFC/mL	Media Log UFC/MI	pH	Media pH	Biomasa g/L	Media biomasa g/L
70	3.4	13.45	13.11	4.48	5.95	0.746	0.866
70	2.5	13.25	13.22	4.54	5.97	0.786	1.199
70	1.7	13.74	13.79	4.53	5.89	1.099	1.292
50	3.4	14	13.14	4.53	4.74	1.052	0.786
50	2.5	13.23	13.63	4.51	5.90	0.846	1.139
50	1.7	13.52	13.36	4.55	5.94	1.099	1.286
30	3.4	14	13.56	4.49	5.97	0.699	0.806
30	2.5	12.99	13.40	4.58	6.01	0.846	1.079
30	1.7	13.51	13.41	4.60	5.64	1.046	1.439