

INTRODUCCIÓN

Durante el crecimiento de las plantas, estas requieren de diversos componentes, para poder sintetizar los materiales estructurales y los que conforman su aparato metabólico. La disponibilidad biológica de nitrógeno, fósforo y potasio es de considerable importancia económica porque son los principales nutrientes vegetales que se derivan del suelo. De los tres, el nitrógeno es el nutriente que se pierde con mayor facilidad ya sea por volatilización o por lixiviación. Este elemento es la unidad estructural de la molécula de proteína sobre la cual se basa toda la vida y por consiguiente es un componente indispensable del protoplasma de las plantas, animales y microorganismos. Una marcada deficiencia de éste elemento en el suelo, reduce la producción y la calidad de las cosechas (González & Lluch, 1992).

Desde el punto de vista de la termodinámica, el nitrógeno gaseoso, N_2 , es la forma más estable de este elemento, esto explica que el reservorio más importante de nitrógeno en la tierra sea la atmósfera. Sin embargo, romper el enlace N-N del nitrógeno molecular requiere una gran cantidad de energía (940kJ) y solo un número de organismos relativamente reducido puede utilizarlo, en el proceso que se conoce como fijación biológica de nitrógeno. La fijación del N_2 es un proceso de reducción que convierte el nitrógeno molecular en amoníaco (asimilable por las plantas). Este proceso es realizado por ciertas bacterias que se hallan libres en el suelo o en simbiosis con las raíces de algunas plantas, especialmente leguminosas; que forman el grupo de bacterias autótrofas de mayor importancia en el suelo (Mayea et al., 1998).

Los procesos naturales de fijación biológica del N_2 juegan un rol importante en la activación de los sistemas agrícolas sustentables. Su incremento puede mitigar la necesidad del uso de fertilizantes nitrogenados sintéticos con su consiguiente efecto benéfico al ciclo del nitrógeno, el calentamiento global y el saneamiento de las aguas subterráneas y superficiales. (Toreto et al, 2001)

Una de las vías para mejorar la fertilidad del suelo y lograr estimular la nutrición de las plantas es la biofertilización que consiste en incrementar la población de

microorganismos benéficos, partiendo de su inoculación a las plantas, semillas o al suelo, utilizando para ello procesos biotecnológicos (Pérez, 1997).

Los biofertilizantes o inoculantes biológicos se presentan como una suspensión de bacterias de interés agronómico, caracterizados por una superpoblación de células obtenidas por fermentación de cepas correctamente seleccionadas. La aplicación agrícola a escala comercial de estos inoculantes, ofrece enormes beneficios ya que además de devolver paulatinamente al suelo sus condiciones naturales originales, constituye una alternativa ecológica para reducir el uso de fertilizantes químicos, disminuyendo considerablemente el costo de producción (Gaitán & García, 1998).

Dentro de las bacterias asimbióticas fijadoras de nitrógeno, las del género *Azotobacter* representan el grupo de bacterias de mayor interés para la agricultura, ya que se multiplican rápidamente y proporcionan muchas ventajas como regular el crecimiento de las plantas, producir hormonas vegetales y generar enzimas que favorecen a la solubilización de fosfatos y oligoelementos, facilitando la asimilación de estos compuestos (Mishustin & Shilnikova, 1969; IAB, 2001).

Según el centro de Investigaciones y Aplicaciones Biotecnológicas de España (IAB, 2001), el uso de inoculantes a partir de *Azotobacter* spp acorta el período de semillero y ciclo total del cultivo, permitiendo la obtención de plantas vigorosas que pueden transplantarse en menor tiempo. Además, aceleran la floración y fructificación, aumentando el número de flores y frutos e incrementando los rendimientos de las cosechas. Esto permite el ahorro de fertilizantes nitrogenados recomendados en las normas técnicas de varios cultivos.

Otra ventaja del uso de biofertilizantes a partir de *Azotobacter* spp es su facilidad en la forma de aplicación y la capacidad que tienen estas bacterias para permanecer vivas por varios años; reproduciéndose en el suelo y potenciando la regeneración de los mismos de manera gradual. Siendo además, totalmente inofensivas para el ser humano y medio ambiente, y aptas para su uso en la agricultura ecológica y producción integrada (Gaitán & García, 1998; IAB, 2001).

A pesar de los beneficios citados anteriormente, el resultado de la aplicación de biofertilizantes depende de la capacidad del microorganismo para adaptarse a las condiciones ambientales del lugar donde se aplique, es decir al tipo y características del suelo; por este motivo, es importante el uso de bacterias autóctonas (Gaitán & García, 1998).

A continuación, se detalla el trabajo realizado para la producción de un biofertilizante a partir de cepas autóctonas de *Azotobacter* spp. Comprende el estudio del comportamiento cinético de las bacterias, así como también la formulación de un medio de cultivo alternativo a partir de melaza y el escalamiento del proceso productivo a diez litros.

CAPÍTULO 1. MARCO TEÓRICO

1.1 Importancia de los microorganismos en la fertilidad del suelo

Se dice que un suelo es fértil cuando brinda a las plantas buenas condiciones para su desarrollo. La fertilidad de un suelo depende de la manera en que se relacionan sus características físicas, químicas y biológicas. Un suelo rico en materia orgánica y microorganismos es un indicador de alta fertilidad y disponibilidad de nutrientes, pues, la fracción biótica de la materia orgánica, formada por organismos vivos, desempeña un papel fundamental en los suelos, al ser la última responsable del estado de la materia orgánica, y en general, del desarrollo y funcionalidad del ecosistema terrestre (Suquilanda, 1996).

Según Suquilanda (1996), los microorganismos influyen sobre los ecosistemas y sobre la fertilidad de los suelos, tanto en el establecimiento de los ciclos biogeoquímicos como en la formación de la estructura de los mismos; ejerciendo una gran influencia en numerosas reacciones de oxidación, hidrólisis y degradación de la materia orgánica, que a su vez tienen un claro reflejo en los ciclos naturales del carbono,

nitrógeno, fósforo y otros elementos, estableciendo con ello las condiciones idóneas para el desarrollo de una cubierta vegetal estable. Esto resulta imprescindible para que un suelo posea una calidad adecuada y por supuesto mantenga una fertilidad natural conveniente.

1.2 Género *Azotobacter*

Como se ha dicho anteriormente, las bacterias del género *Azotobacter* forman un grupo especial de microorganismos fijadores de nitrógeno, se multiplican rápidamente y proporcionan muchas ventajas, como regular el crecimiento de las plantas, producir hormonas vegetales y favorecer la solubilidad de la materia orgánica agregada al suelo como abono (Mishustin & Shilnikova, 1969; Ramos, 1992).

La aplicación práctica de la inoculación de *Azotobacter* spp ha sido positiva, observándose notables incrementos en los rendimientos de diferentes cultivos, principalmente en cereales (González y Lluch, 1992).

Rodríguez y Blanco (2001) realizaron un trabajo experimental en viveros de café (*Coffea arabica*), demostrando que con el uso de *Azotobacter chroococcum* hay una mejor uniformidad en las posturas de este cultivo, así como un mayor vigor de las mismas, las cuales en el momento de la extracción del vivero hacia el campo presentan un color uniforme en su sistema radicular, característica de posturas sanas, vigorosas y con alto valor ecológico.

González-López et al. (1986), al analizar los resultados de la inoculación de 8 cepas de *Azotobacter* sobre los parámetros de crecimiento y desarrollo de vitroplantas de piña (*Ananas comosus*), durante la fase de adaptación, demostraron que en sentido general todas las cepas estudiadas estimularon el crecimiento de las vitroplantas, con valores significativamente superiores al testigo, lo que permitió acortar el periodo de adaptación de las mismas.

Se ha demostrado que, mediante la aplicación de biofertilizantes a partir de *Azotobacter* spp, se puede llegar a fijar de 20 a 30 kg de nitrógeno/ha/año y en algunos

casos se puede llegar a fijar cantidades superiores, si se dan las condiciones óptimas de crecimiento (IAB, 2001); sin embargo, los resultados, obtenidos especialmente con la inoculación de *Azotobacter chroococcum*, no deben atribuirse exclusivamente a la ganancia de N₂ por las plantas, ya que su efecto beneficioso se debe fundamentalmente a la capacidad de solubilizar fosfatos y sintetizar sustancias estimuladoras del crecimiento vegetal, tales como, vitaminas y hormonas vegetales que intervienen directamente sobre el desarrollo de las plantas (González y Lluch, 1992; De Troch, 1993; Baldiani, 1997; Mayea et al., 1998; Velazco y Castro, 1999; Itzigsohn, 2000; Rodelas, 2001).

Según Rodelas (2001), *A. chroococcum* sintetiza tiamina de 50–100 mg.g⁻¹ de sustancia celular seca; ácido nicotínico de 200–600 mg.g⁻¹ de sustancia celular seca, y otras sustancias como: ácido pantoténico, biotina, ácido indolacético (AIA), ácido giberélico, citoquininas entre otros promotores de crecimiento.

Estas bacterias tienen la ventaja de ser aplicadas a cualquier cultivo, en cualquier época de desarrollo de la planta, antes o durante la siembra, en la germinación y en los trasplantes (Rodríguez & Blanco, 2001).

1.2.1 Clasificación científica

Cómo se muestra en el cuadro 1.1, el género *Azotobacter* pertenece a la familia *Azotobacteraceae* que agrupa bacterias Gram negativas, quimioheterotrofas, aerobias estrictas, capaces por sí solas, de fijar nitrógeno molecular (Holt, et al, 1994; Ramos, 1992; Espín, 2000).

Fue descrito por primera vez por Beijerinck (1901) y en la actualidad incluye seis especies: *A. chroococcum*, *A. vinelandii*, *A. beijerinckii*, *A. nigricans*, *A. armeniacus* y *A. paspali* (Ramos, 1992).

Cuadro 1. 1 Clasificación taxonómica del género *Azotobacter* (Ramos, 1992)

REINO	Bacteria
PHYLUM	Proteobacteria

CLASE	Gamma proteobacteria
ORDEN	Pseudomonadales
FAMILIA	Azotobacteraceae
GÉNERO	<i>Azotobacter</i>

1.2.1 Características generales

Las bacterias del género *Azotobacter* tienen un diámetro celular de 1.5 a 2.0 μm , son pleomórficas, variando su morfología desde bacilos hasta células en forma de cocos. Se les observa como células individuales, como pares o formando agregados irregulares, y algunas veces formando cadenas de tamaño variable (Figura 1.1). Se reproducen por fisión binaria y se mueven por flagelos peritricos (Espín, 2000)

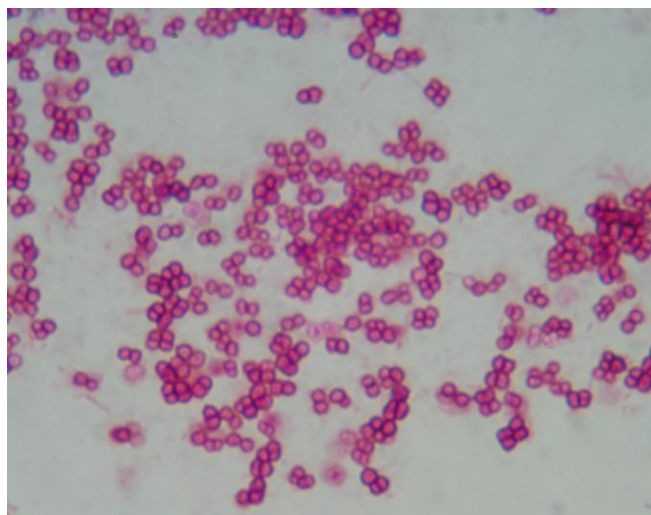


Figura 1. 1 Tinción Gram de *Azotobacter* spp vista en el microscopio óptico (100X).
(Cristina Echeverría; Quito, julio 2006)

No producen endosporas pero sí quistes de resistencia a drogas. La formación de quistes ha sido muy estudiada, es un fenómeno que se produce ante condiciones ambientales adversas y en el laboratorio puede inducirse pasando el cultivo de un medio con glucosa a uno con b-hidroxibutirato como única fuente de carbono (Lin y Sadoff, 1968).

Son bacterias no proteolíticas y catalasa positivas. Son aerobias, quimioheterótrofas, utilizan azúcares, alcoholes y sales inorgánicas para crecer. Pueden crecer en concentraciones bajas de oxígeno. El rango de pH en el que crecen en presencia de nitrógeno combinado es de 4.8-8.5. El pH óptimo para crecer cuando fijan nitrógeno es de 7.0-7.5. Son mesófilas, su temperatura óptima de crecimiento ronda los 30°C (Mayea et al., 1998).

Son fijadoras no simbióticas de nitrógeno. En vida libre fijan al menos 10 mg de N₂ por gramo de carbohidrato (glucosa) consumido. Requieren molibdeno para fijar nitrógeno que puede ser parcialmente reemplazado por vanadio. Utilizan nitrato y sales de amonio y ciertos aminoácidos como fuentes de nitrógeno (Espin, 2000; Gaitán & García, 1998).

Diversas especies del género producen una serie de sustancias de interés biotecnológico: alginatos, poli- α -hidroxibutirato (Horan *et al.*, 1983), pigmentos y hormonas vegetales como auxinas, citoquininas y giberelinas (González-López et al., 1986).

1.3 Biofertilizantes

Un biofertilizante o inoculante biológico es un producto que está formado por microorganismos vivos o en estado de latencia (esporas), capaces de realizar de las siguientes funciones (García, 2001):

- Fijar Nitrógeno.
- Movilizar Fósforo.
- Potenciar la acción de algunos Nutrientes.
- Producir sustancias activas.

Los biofertilizantes se utilizan directamente sobre la semilla o también sobre el suelo, con el objetivo de mejorar los procesos fisiológicos que producen el crecimiento de las plantas. Los biofertilizantes para uso agrícola se elaboran a partir de diferentes microorganismos, que tienen un efecto positivo sobre los procesos de descomposición y síntesis que se dan en el suelo, con el fin de (García, 2001):

- Aumentar la producción, en el ámbito agrícola.
- Disminuir las zonas desérticas (Promoción de la vegetación)
- Reducir la erosión de los suelos.
- Facilitar las reforestaciones.

El biofertilizante está caracterizado como un bien de consumo final duradero, ya que su vida útil no se extingue a medida que se utiliza en los cultivos agrícolas. Las bacterias contenidas en el inoculante se establecen y se multiplican en el suelo para formar poblaciones suficientemente elevadas, capaces de producir una concentración de sustancias fisiológicamente activas que sean aprovechadas por las plantas y recíprocamente la bacteria en el suelo se alimenta de las sustancias nutritivas que le suministra la planta a través de las secreciones radicales (Gaitán & García, 1998).

1.4 Producción y desarrollo

La producción de biofertilizantes a partir de *Azotobacter* spp, requiere del crecimiento o multiplicación del microorganismo en un medio nutritivo adecuado bajo condiciones controladas. Cuando las bacterias se cultivan en un medio adecuado y en condiciones adecuadas, ocurre un incremento de células en períodos muy cortos. En algunas especies se alcanza la población máxima en 24 horas, en cambio, en otras se necesita un período más prolongado para alcanzar el máximo desarrollo. Para determinar el desarrollo se necesita medir cuantitativamente la población de células al inicio de la siembra y durante el transcurso de la incubación. El ciclo de desarrollo de las poblaciones bacterianas es el procedimiento más importante en la reproducción (Pérez, 1997).

Para producir una bacteria es necesario tomar en cuenta ciertas condiciones ambientales que influyen en el crecimiento. Estas son: tiempo, alimento, agua, temperatura, pH y disponibilidad de oxígeno (Pérez, 1997; Gaitán & García, 1998).

1.4.1 Tiempo

Cuando se siembra en un medio de cultivo fresco un número determinado de microorganismos y se determina la población bacteriana durante el lapso de tiempo entre la primera división de una célula y la próxima, el rango de tiempo es tan pequeño como de 10 a 12 minutos hasta producir millones de una célula en horas. Si la bacteria crece en un medio líquido, en la mayoría de los casos las células que se producen en cada división continúan su vida independientemente formándose una suspensión de células libres. Sin embargo, la velocidad de división de una célula no puede ser sostenida por un período largo de tiempo porque el ambiente que rodea a la célula cambia (Scragg, 2000).

Cómo se muestra en la figura 1.1, en un cultivo discontinuo de bacterias en medio líquido, se pueden diferenciar cuatro fases de crecimiento con respecto al tiempo: fase lag o de adaptación, fase exponencial, fase estacionaria y fase de muerte (Pérez, 1997; Gaitán & García, 1998; Scragg, 2000):

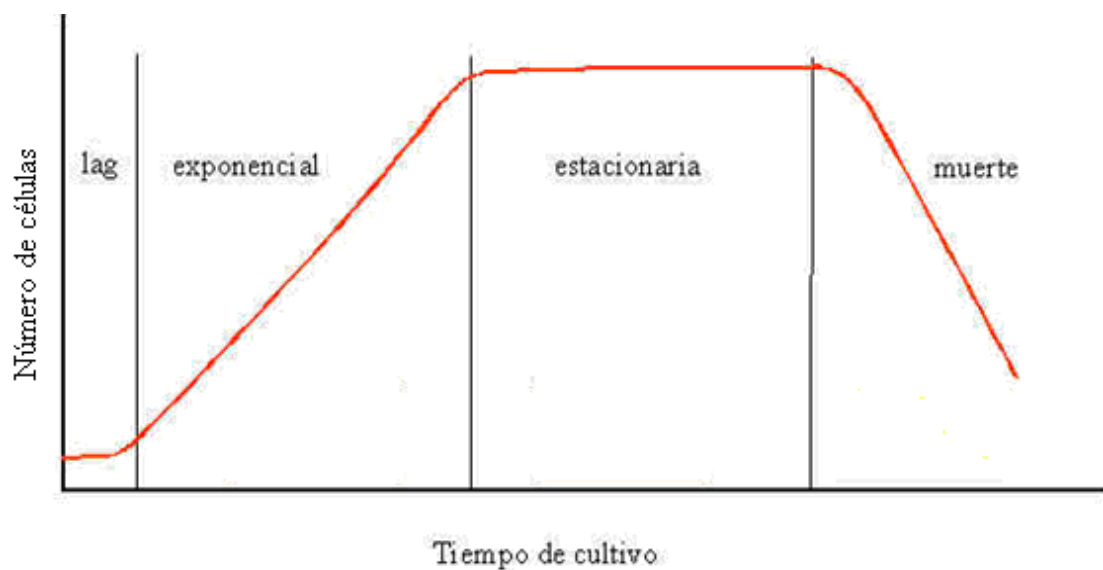


Figura 1. 2 Fases del crecimiento bacteriano en cultivo discontinuo.
(Scragg, 2000)

Fase lag o de adaptación:

Durante esta fase, los microorganismos adaptan su metabolismo a las nuevas condiciones ambientales (abundancia de nutrientes y condiciones de cultivo) para iniciar la fase de crecimiento exponencial. En esta fase, el aumento y reproducción de una

población microbiana no está en correspondencia con el tiempo transcurrido, esto no quiere decir que las células permanezcan inactivas ó latentes, al contrario durante esta fase cada una de las células incrementa su tamaño. Las bacterias en este ambiente fresco pueden quizás encontrarse deficientes de enzimas y coenzimas que primero deben ser sintetizadas en las cantidades necesarias (Scragg, 2000).

Fase exponencial:

En esta fase, la velocidad de crecimiento es máxima y el tiempo de generación es mínimo. Durante esta fase las bacterias consumen a velocidad máxima los nutrientes del medio. Durante este período las células se multiplican generalmente a ritmo constante. La velocidad de crecimiento varía con las condiciones ambientales y la composición del medio de cultivo (Scragg, 2000).

Fase estacionaria:

En esta fase no se incrementa el número de bacterias (ni la masa u otros parámetros del cultivo). Las células en fase estacionaria desarrollan un metabolismo diferente al de la fase exponencial y durante ella se produce una acumulación y liberación de metabolitos secundarios que pueden tener importancia industrial. Los microorganismos entran en fase estacionaria porque se agota algún nutriente esencial del medio o porque los productos de desecho que han liberado durante la fase exponencial hacen que el medio sea inhóspito para el crecimiento microbiano (Scragg, 2000).

Fase de muerte:

En esta fase se produce una reducción del número de bacterias viables del cultivo. Después del período estacionario las bacterias mueren más rápidamente, siendo mayor el número de células que mueren y menor el número de células que se producen. Gran variedad de condiciones contribuyen a la muerte de la bacteria pero las más importantes son el agotamiento de sustancias nutritivas esenciales y la acumulación de productos inhibidores como ácidos. (Scragg, 2000).

1.4.2 Nutrientes

Todos los organismos requieren de una fuente de alimento que provea los elementos químicos básicos, de los cuales el protoplasma de las células es construido y actúa como una fuente de energía. Estos elementos son: carbono, hidrógeno, oxígeno, nitrógeno, azufre, fósforo, magnesio, hierro y otros. Algunos organismos obtienen estos alimentos de fuentes orgánicas, mientras más comúnmente, otros la obtienen de una mezcla de sustancias orgánicas e inorgánicas (Scragg, 2000).

Varias sustancias pueden actuar como fuente de carbono, entre ellos los carbohidratos (monosacáridos, disacáridos y algunos polisacáridos), ácidos alifáticos y aromáticos, alcoholes, compuestos volátiles, entre otros. Las distintas especies del género *Azotobacter* y aún cepas dentro de una misma especie, difieren en cuanto a la fuente de carbono que utilizan. En el suelo, estas bacterias utilizan una amplia gama de compuestos orgánicos y de productos de descomposición de plantas y animales. Se ha comprobado que, en suelos ricos en humus, cuando no hay residuos orgánicos frescos, la población de *Azotobacter* es pobre (Martínez, 1996).

La propagación de *Azotobacter* depende de la concentración de varias sales inorgánicas:

- La ausencia o deficiencia de fósforo y potasio en el medio, disminuye la velocidad de crecimiento. El fósforo, estimula el metabolismo del carbono, la manipulación y la fijación de nitrógeno (Sabra et al., 1999).
- El calcio y el magnesio juegan un rol importante en el crecimiento de *Azotobacter*. Una deficiencia de calcio en el medio produce una prolongación de la fase Lag. Sin embargo, la concentración de calcio no debe ser excesiva. El magnesio no es un elemento esencial en la fijación de nitrógeno pero es un requerimiento esencial para *A. chroococcum* de 20-30 ppm en el medio (Mishustin & Shilnikova, 1969; Dhanasekar et al, 2003).

- La concentración de cobre en el medio es tóxica aún en mínimas cantidades (*Becking, 1961*). Los requerimientos de hierro son muy pequeños. El manganeso ejerce una acción favorable aunque tampoco es esencial (*Gaitán & García, 1998*).

A pesar de que las bacterias del género *Azotobacter* son fijadoras de nitrógeno, la adición de nitrógeno en el medio disminuye la fase Lag y el tiempo de generación, disminuyendo consecuentemente el tiempo de fermentación (*Vermani et al., 1997*). En términos generales, las exigencias nutricionales de estas bacterias son mucho más complejas de lo que supone. Algunos autores señalan la necesidad de incluir vitaminas en el medio, aunque normalmente ninguno de los medios conocidos las tiene en su composición, limitándose como máximo a incluir extracto de suelo; pero esto no basta para satisfacer las necesidades en factores de crecimiento, por lo que ha recomendado al medio nutritivo, extracto de levadura entre 0.3 y 0.5 % (*Gaitán & García, 1998*).

1.4.3 Agua

Todos los organismos vivos requieren de agua para subsistir. El agua participa en las reacciones internas de las células. Es el componente que se encuentra en mayor cantidad. Facilita el paso de sustancias alimenticias solubles; a través de ésta los nutrientes son transportados hacia el interior de las células y de la misma forma los productos de desecho son eliminados por el agua (*Scragg, 2000*).

1.4.4 Temperatura

Todos los microorganismos tienen una temperatura óptima de crecimiento. Esto significa que a determinada temperatura la velocidad de duplicación (o la velocidad de crecimiento poblacional) de los microorganismos es mayor. Además presentan una temperatura mínima y máxima de crecimiento como se puede apreciar en el Cuadro 1.2 (*Scragg, 2000*).

Cuadro 1.2 Clasificación de los microorganismos de acuerdo a la temperatura de crecimiento
(*Scragg, 2000*)

Clasificación	Rango	Óptima
Termófilos	25 - 80 °C	50 - 60 °C

Mesófilos	10 - 45 °C	20 - 40 °C
Psicrófilo	-5 - 30 °C	10-20 °C

La temperatura afecta la estabilidad de las proteínas celulares porque induce cambios conformacionales que alteran la actividad biológica de estos compuestos, especialmente la de enzimas.

Para *Azotobacter* la temperatura óptima de crecimiento se encuentra entre los 25-30°C y la temperatura mínima se encuentra apenas sobre los 0°C. No pueden tolerar altas temperaturas, si se mantienen a temperaturas de 45 a 48°C se degeneran y mueren (Mishustin and Shilnikova, 1969). La temperatura óptima para cultivar *Azotobacter*, en un reactor batch utilizando glucosa como fuente de carbono es 30°C. A los 28 y 32°C el crecimiento disminuye (Dhanasekar et al, 2003).

1.4.5 pH

Los microorganismos pueden crecer y multiplicarse únicamente dentro de ciertos rangos de pH. Si los microorganismos no cuentan con el pH correspondiente se inhibe su crecimiento y desarrollo. Como se muestra en el cuadro 1.3 los microorganismos se clasifican en acidófilos, neutrófilos y alcalófilos de acuerdo al pH en el que crecen (Scragg, 2000).

Cuadro 1. 3 Clasificación de los microorganismos de acuerdo al pH en el que crecen (Scragg, 2000)

Clasificación	pH externo	pH interno
Acidófilos	1.0 - 5.0	6.5
Neutrófilos	5.5 - 8.5	7.5
Alcalófilos	9.0 - 10.0	9.5

El género *Azotobacter* puede crecer en un rango de pH relativamente amplio, desde 4.5 a 9.0. Sin embargo las diferentes especies del género difieren en su sensibilidad a medios ácidos. El pH óptimo para el crecimiento se encuentra entre 7.2 y

8.2 (Mishustin and Shilnikova, 1969), obteniéndose el máximo crecimiento a pH 7.5 (Dhanasekar, 2003).

1.4.6 Disponibilidad de oxígeno

Los microorganismos aerobios requieren de oxígeno del ambiente que los rodea para respirar. Por tanto, es necesario garantizar a la especie bacteriana en cuestión un ambiente en donde pueda obtener fácilmente la cantidad de oxígeno que esta requiere. (Scragg, 2000).

Las bacterias del género *Azotobacter* son aerobias, por lo tanto necesitan de oxígeno para poder crecer (Mandigan et al., 2003).

1.5 Fermentación discontinua

La fermentación discontinua (en batch) es una técnica muy utilizada para la producción de microorganismos de interés industrial. Consiste en añadir, al inicio de la operación, la solución esterilizada de nutrientes e inocularla con el microorganismo, permitiendo que se lleve a cabo la incubación en condiciones óptimas de fermentación. A lo largo de toda la fermentación no se añade nada, excepto oxígeno (en forma de aire), un agente antiespumante y ácidos o bases para controlar el pH. La composición del medio de cultivo, la concentración de la biomasa y la concentración de metabolitos cambia generalmente como resultado del metabolismo de las células observándose las cuatro fases típicas de crecimiento: fase de adaptación, fase logarítmica, fase estacionaria y fase de muerte (Scragg, 2000).

En los procesos comerciales, la fermentación frecuentemente se interrumpe al final de la fase logarítmica (metabolitos primarios) o antes de que comience la fase de muerte (metabolitos secundarios), debido a que en estas fases se obtiene el mayor crecimiento bacteriano y por lo tanto el mayor beneficio (Scragg, 2000).

En la fermentación discontinua, los microorganismos crecen en un volumen fijo de nutrientes que continuamente es alterado hasta su agotamiento por el crecimiento

bacteriano (Figura 1.3). No se renuevan los aportes de nutrientes ni se eliminan los residuos. El crecimiento exponencial dura solo unas pocas generaciones (Scragg, 2000).

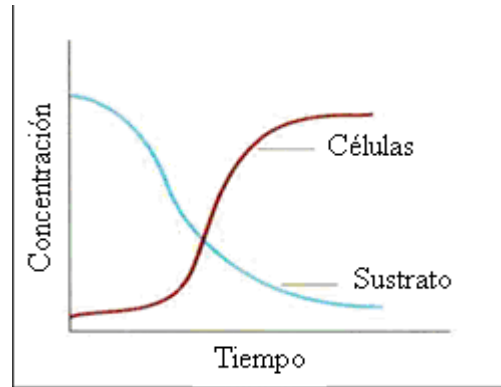


Figura 1.3 Crecimiento celular en cultivo discontinuo.
(Scragg, 2000)

La fermentación generalmente se lleva a cabo en un fermentador o biorreactor, que es un recipiente especialmente diseñado para mantener un ambiente biológicamente activo. El fermentador tiene una función primordial: Proporcionar, en la forma más homogénea posible, las condiciones químicas y físico-químicas en las que el cultivo presente los máximos rendimientos (Gaitán & García, 1998, Scragg, 2000).

El proceso productivo del Biofertilizante, mediante fermentación discontinua, requiere básicamente de cuatro etapas (Gaitán & García, 1998):

1. La preparación y esterilización del medio de cultivo
2. La obtención del pre-inóculo.
3. La fermentación
4. La recuperación y almacenamiento del producto.

CAPÍTULO 2. METODOLOGÍA

2.1 Ubicación Geográfica

El presente trabajo fue realizado en el laboratorio AGRODIAGNOSTIC de la ciudad de Quito durante los meses comprendidos entre marzo y octubre del 2006. El trabajo incluye únicamente la fase de laboratorio.

2.2 Obtención de las cepas bacterianas

Las cepas bacterianas utilizadas para la producción del biofertilizante fueron aisladas y seleccionadas por el laboratorio AGRODIAGNOSTIC. Se obtuvieron a partir de muestras de suelo provenientes de cultivos de flores, hortalizas y frutas ubicados en la serranía Ecuatoriana. Para la producción del biofertilizante se contó con 25 cepas de *Azotobacter* spp debidamente seleccionadas (Anexo A).

Las cepas seleccionadas se mantuvieron con glicerol a una temperatura de 0°C para garantizar la conservación de las mismas (Figura 2.1).



Figura 2. 1 Banco de cepas madre de *Azotobacter* spp ubicado en el laboratorio Agrodiagnostic. (Cristina Echeverría; Quito, marzo 2006)

2.3 Selección del medio de cultivo

En el caso de *Azotobacter*, existen una variedad de medios de cultivo químicamente definidos, recomendados por la literatura, entre ellos se encuentran el Caldo Ashby y el Caldo Pikovskaya modificado; sin embargo, el medio de cultivo que se utilice en la fermentación no solo debe cubrir las necesidades nutritivas del microorganismo en cuestión, sino también con las exigencias del proceso de producción (costo y eficiencia) del mismo. (Pérez, 1997; Martínez, 2005).

El Caldo Ashby es un medio de cultivo selectivo para *Azotobacter* debido a que no contiene nitrógeno (*Anexo C*). Su ventaja es que al ser un medio selectivo disminuye la probabilidad de contaminación con otras bacterias y su desventaja es que el crecimiento es lento, es observable a partir de los 3 o 5 días de realizada la siembra lo que implica un gasto mayor de energía para la producción (Pérez, 1997; Gaitán & García, 1998).

El Caldo Pikovskaya modificado es un medio no selectivo pero permite el crecimiento rápido de las bacterias (aproximadamente 24h) y requiere un gasto de energía menor (Martínez, 2005).

En ambos casos se necesitan reactivos químicos que implican un costo adecuado solo para producciones pequeñas a escala de laboratorio, por este motivo se formuló un medio de cultivo alternativo a base de melaza tomando al Caldo Pikovskaya modificado como patrón.

2.3.1 Formulación del medio de cultivo alternativo

Se partió de un estudio químico de la composición de la melaza y se procedió a sustituir los componentes del medio químicamente definido (CPM), por el medio natural, que como se muestra en el análisis realizado (*Anexo B*), constituye un medio adecuado para el crecimiento de microorganismos (Ivanova, 1995; Pérez, 1997).

Se tomó como base la fuente de carbohidratos y proteínas (Carbono y nitrógeno), garantizando el contenido requerido por la bacteria, según el caldo Pikovskaya modificado (Pérez, 1997).

Una vez obtenida la concentración teórica de melaza necesaria para sustituir los componentes del medio químico se realizaron pruebas de crecimiento a nivel de laboratorio, para ello se sembraron cepas de *Azotobacter* en CA sólido utilizando concentraciones menores y mayores a la obtenida teóricamente. Las siembras se realizaron por triplicado (Pérez, 1997).

2.4 Producción del biofertilizante a nivel de laboratorio

2.4.1 Reactivación de las cepas bacterianas.

Para reactivar a las bacterias se utilizó el Caldo Pikovskaya modificado líquido, ideal para el crecimiento de *Azotobacter* spp (Anexo C). El caldo correctamente preparado se vertió en tubos de ensayo (5ml/tubo) y se esterilizó. Posteriormente se inoculó cada tubo con la cepa madre bajo condiciones de esterilidad y se incubó a 30°C por 24 horas (Gaitán & García, 1998).

2.4.2 Obtención del preinóculo

Para la preparación del preinóculo se tomaron en cuenta los siguientes requisitos:

1. El cultivo debe estar metabólicamente activo y libre de contaminantes. Para ello se trabajó bajo normas estrictas de esterilidad y se realizó un control permanente del cultivo mediante la observación directa al microscopio de las características del microorganismo utilizando técnicas microbiológicas descritas más adelante (Gaitán & García, 1998).

2. El inóculo debe estar en su fase exponencial (grado máximo de desarrollo). Para ello se evaluó el crecimiento bacteriano durante 30 horas que es el tiempo estimado que tarda en alcanzar la fase exponencial. Se procuró obtener preinóculos con una concentración de biomasa del orden de 10^8 - 10^9 células/ml (Gaitán & García, 1998)
3. Se debe disponer de una cantidad de cultivo suficiente para inocular el volumen de medio líquido a utilizar en la fermentación, el cual debe estar entre el 3-10% del volumen total a fermentar (Trevan, 1990). En este caso se trabajó con un volumen equivalente al 10% del volumen total a fermentar.

Procedimiento:

Con las cepas reactivadas anteriormente se realizó un pool bacteriano. 10 ml del pool fueron inoculados en 90 ml de Caldo Pikovskaya modificado (10% del volumen total a fermentar) y otros 10 ml fueron inoculados en 90ml del Caldo Alternativo, obteniéndose un volumen final de 100 ml de cultivo por cada caldo de fermentación (Figura 2.2). Posteriormente fueron incubados a 30°C por 24h y 150 rpm en matraces de 250ml (Gaitán & García, 1998).



Figura 2. 2 Preinóculos de *Azotobacter* spp en Caldo Alternativo melaza (izquierda) y Caldo Pikovskaya modificado (derecha). (Cristina Echeverría; Quito, Abril 2006)

2.4.3 Fermentación discontinua

Una vez obtenidos los preinóculos, éstos fueron inoculados en 900ml de CPM y 900 ml de CA. Posteriormente, fueron incubados a una temperatura promedio de 28°C por 72h (figura 2,3). El oxígeno fue suministrado utilizando un aireador para pecera (Power 500) con un flujo de aire aproximado de 1m³/h en matraces de 2000 ml (Gaitán & García, 1998).



Figura 2.3 Inóculos a escala de laboratorio de *Azotobacter* spp en Caldo Alternativo melaza (izquierda) y Caldo Pikovskaya modificado (derecha).
(Cristina Echeverría; Quito, abril 2006)

El esquema del proceso global de producción de *Azotobacter* spp a nivel de laboratorio se muestra en la figura 2.4

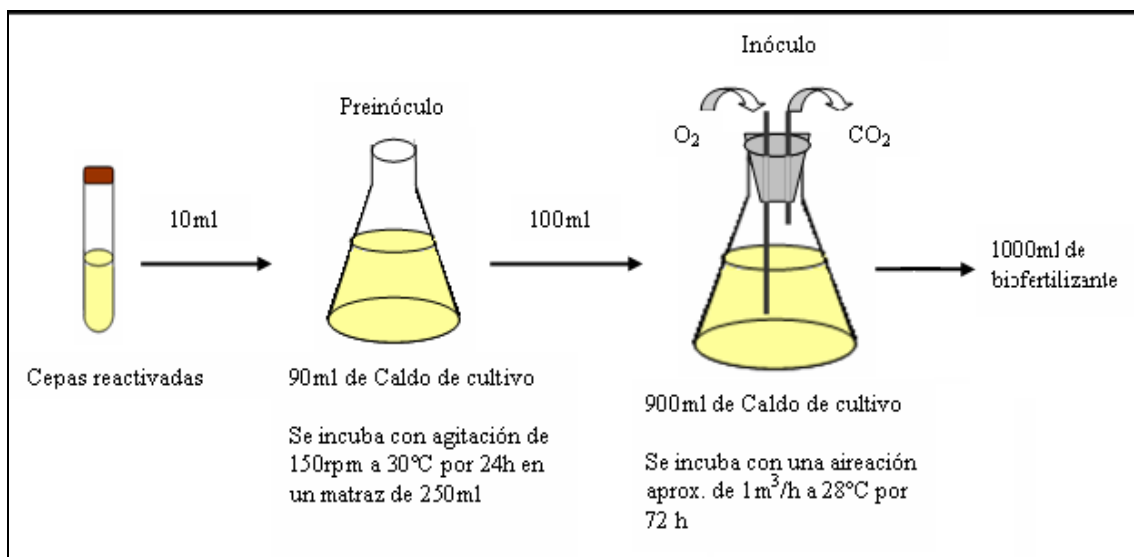


Figura 2. 4 Esquema del proceso de fermentación a escala banco de laboratorio (Cristina Echeverría; Quito, abril, 2006)

2.5 Evaluación del crecimiento bacteriano

Se realizaron una serie de corridas cinéticas en las que se evaluó, la variación de pH, la temperatura del caldo de cultivo y la concentración de biomasa. Además se evaluó el consumo de sustrato en CPM con lo que se pudieron obtener las variables cinéticas de crecimiento. Las muestras fueron tomadas cada tres horas (figura 2.5), durante las 72 horas que duró la fermentación. Éste procedimiento se realizó tres veces.



Figura 2. 5 Toma de muestras del inóculo a escala de laboratorio (1L). (Cristina Echeverría; Quito, mayo 2006)

2.5.1 Determinación de la concentración de biomasa

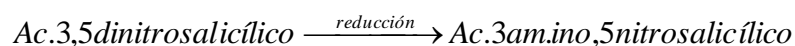
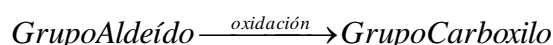
Se utilizó la técnica de determinación de biomasa por densidad óptica para el CPM y la determinación del PSC para el CA, debido a que por el color de la melaza fue imposible medir la absorbancia. Además se realizaron conteos de colonias en caja para determinar las unidades formadoras de colonias por litro (Gaitán & García, 1998; Dhanasekar, 2003)

Se midió la absorbancia de cada muestra a 540 nm y posteriormente se obtuvo la concentración de biomasa en gramos por litro utilizando la curva de calibración de absorbancia en función de peso seco para *Azotobacter* (Anexo D). Se utilizó medio estéril como blanco (Martínez, 2005).

Para el conteo de bacterias en caja se realizaron diluciones de 10^{-1} a 10^{-9} y se sembraron en CPM sólido. Cada dilución se realizó por duplicado (Gaitán & García, 1998).

2.5.2 Evaluación del consumo de glucosa

Para determinar el consumo de glucosa se utilizó la técnica del DNS que se basa en el uso de ácido 3,5-dinitrosalicílico para provocar la oxidación de los azúcares y, al mismo tiempo, su propia reducción, desarrollándose la siguiente reacción:



Según lo anterior, una mole de azúcar reacciona con una mole de ácido 3,5-dinitrosalicílico, dando lugar a una relación estequiométrica que permite conocer la cantidad de azúcares reductores presentes en la muestra. Esta reacción, además, puede ser leída fácilmente al espectrofotómetro ya que da lugar a una reacción colorimétrica: el ácido 3,5-dinitrosalicílico de color amarillo cambia al ácido 3-amino, 5-nitrosalicílico de un color pardo oscuro-marrón, cuya intensidad es proporcional a la cantidad de azúcares reductores (Martínez, 2005).

Procedimiento:

Se centrifugó cada muestra por 10 minutos a 5000 rpm. Posteriormente se recuperó el sobrenadante en tubos limpios. Se prepararon tubos de ensayo forrados con papel aluminio para protegerlos de la luz y se colocó 0.25ml de sobrenadante con 0.25ml del reactivo 3,5 DNS en cada uno. Además se preparó un blanco al que se le colocó únicamente el reactivo. Se llevaron los tubos a ebullición por 5 minutos y posteriormente se frenó la reacción con hielo. Finalmente se agregaron 2.25 ml de agua destilada en cada tubo y se leyó la absorbancia a 546nm ajustando a cero con el blanco. En el blanco se colocaron 2.75 ml de agua para completar el volumen (Martínez, 2005).

Se utilizó la curva de calibración de absorbancia en función de glucosa para obtener la concentración residual de sustrato en gramos por litro (Anexo E).

2.5.3 Evaluación de la variación de pH

De cada muestra tomada se midió el pH para determinar la variación del mismo durante la fermentación, para ello se utilizó un pH metro previamente calibrado.

2.5.4 Evaluación de la temperatura del caldo de cultivo

La temperatura del caldo de cultivo fue medida durante todo el proceso de producción del biofertilizante utilizando para ello un termómetro acoplado al equipo de fermentación.

2.5 Escalado del proceso productivo

Se conoce como escalado a la acción de reproducir (aproximadamente) aquellas operaciones tecnológicamente importantes de un proceso en otra escala, mayor o menor (Scragg, 2000).

Las condiciones requeridas para el desarrollo de procesos bioquímicos son: temperatura, presión, concentración de nutriente, concentración de oxígeno, pH y la concentración de biomasa (número de células por unidad de volumen). La temperatura y concentración del oxígeno son usualmente las condiciones críticas para el escalado. El pH puede ser controlado separadamente, y los nutrientes pueden ser agregados en exceso (Scragg, 2000).

Procedimiento general de escalado:

Para la producción a escala diez litros se siguieron los mismos pasos que para la escala de laboratorio. Los cálculos de concentración de nutrientes y oxígeno se obtuvieron por relación utilizando para ello una regla de tres simple.

1. Se determinó el volumen requerido y la capacidad de producción deseada. En este caso, el volumen requerido fue de diez litros con una concentración aproximada de 8 a 10×10^{10} UFC/L (IAB, 2001; Martínez, 2005).
2. Se calcularon las dimensiones del equipo por semejanza geométrica. Se utilizaron botellones de 20L de capacidad (Scragg, 2000).
3. Se escogió una estrategia de escalado. En fermentaciones aeróbicas la técnica más comúnmente utilizada es mantener el K_{LA} o coeficiente volumétrico de transferencia de masa (O_2) constante. Para *Azotobacter* se recomienda un flujo de aire de $17 \text{ m}^3/\text{h}$ para reactores de hasta 25 litros de capacidad (Gaitán & Garccía, 1998). El oxígeno se suministró con un compresor de 3hp a 60 psi cuyo flujo de aire es de aproximadamente $9 \text{ m}^3/\text{h}$ (Gaitán & Garccía, 1998).

En la figura 2.6, se observa la producción de biofertilizante a escala diez litros.



Figura 2. 6 Producción de biofertilizante a partir de *Azotobacter* spp a escala diez litros en Caldo Pikovskaya modificado (izquierda) y Caldo alternativo melaza (derecha). (Cristina Echeverría; Quito, octubre 2006)

2.6 Viabilidad del producto en condiciones de laboratorio

Para determinar la viabilidad del producto se almacenó el producto terminado en envases plásticos cerrados y se los colocó en refrigeración (4°C) bajo condiciones lo más higiénicas posible para evitar la contaminación (figura 2.7).



Figura 2. 7 Producto terminado del biofertilizante producido a partir de cepas autóctonas de *Azotobacter* spp en Caldo Pikovskaya modificado y Caldo alternativo melaza. (Cristina Echeverría; Quito, octubre 2006).

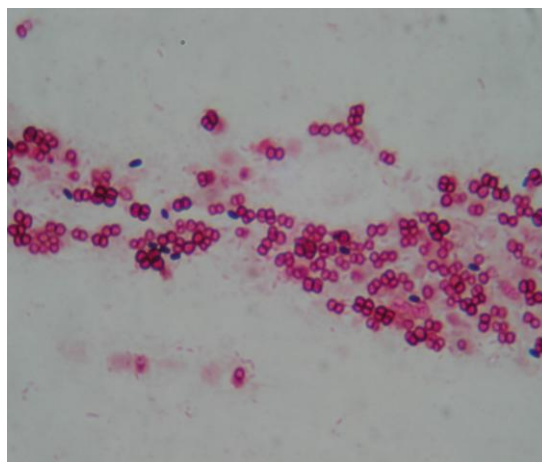
Cada semana se evaluó el estado del producto mediante observación directa al microscopio. Se evaluó la población microbiana, la actividad y la contaminación por un período de dos meses y medio que es el tiempo mínimo requerido por la empresa auspiciante. Además se realizaron conteos de colonias en caja utilizando el medio Ashby como medio de cultivo selectivo.

2.7 Técnicas microbiológicas

2.7.1 Tinción Gram

- Se preparan frotis del cultivo. Se secan al aire y se fijan al calor.
- Se cubre el frotis con el reactivo cristal violeta durante un minuto.
- Se lava el frotis con agua durante 5 segundos, y luego se aplica el reactivo yodo de Lugol durante un minuto.
- Se lava y se aplica el decolorante.
- Se lava y se cubre con el reactivo de Safranina durante 30 segundos.
- Se lava, se seca y se coloca en el microscopio (Pérez, 1997).

En la figura 2.8 se puede observar un ejemplo de tinción gram vista en el microscopio.



**Figura 2. 8 Tinción Gram vista al microscopio óptico (100x).
(Cristina Echeverría; Quito, junio 2006)**

2.7.2 Prueba de Quiste

- Se coloca un asa del cultivo en un portaobjeto, emulsionado con agua estéril.
- Se agrega una o dos gotas de Yodo Lugol y se fija al aire.
- Se coloca al microscopio con aceite de inmersión (Pérez, 1997).

En la figura 2.9 se observa un ejemplo de la prueba de quiste vista al microscopio óptico.

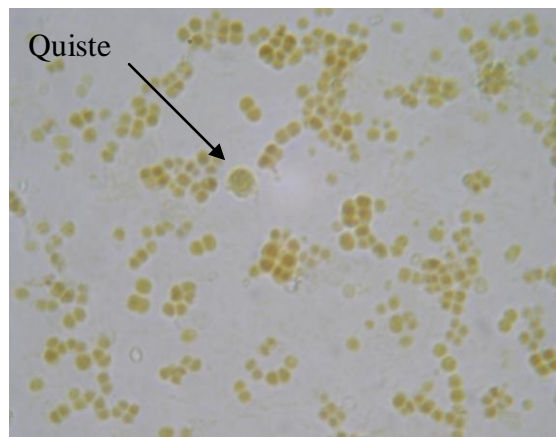


Figura 2.9 Prueba de quiste de *Azotobacter spp.* vista al microscopio óptico (100x).
(Por: Cristina Echeverría; Quito, junio 2006)

2.7.3 Peso seco celular (PCS g/ml)

- Se toman 5ml de cada dilución y se elimina en el horno el sobrenadante
- Se pesa la biomasa seca y se obtiene el PSC en gr/ml (Pérez, 1997).

2.8 Análisis de datos

Para analizar los datos obtenidos se utilizaron regresiones lineales con el objetivo de determinar la tendencia del crecimiento bacteriano en ambos medios de cultivo.

CAPÍTULO 3. RESULTADOS

3.1 Formulación del medio de cultivo alternativo

De acuerdo al análisis químico de la melaza utilizada para la producción del caldo de cultivo alternativo (Anexo B), la cantidad de melaza necesaria para garantizar una concentración de diez gramos de azúcares reductores por litro de cultivo es de 41 gramos. Sin embargo, se observó, que al sembrar *Azotobacter* spp en concentraciones superiores de melaza, se produce un aumento en el crecimiento bacteriano. Este aumento fue apreciable hasta una concentración de 60 gramos por litro. A concentraciones superiores el crecimiento se mantuvo constante. De esta manera se estableció una concentración de 60 gramos de melaza por cada litro de caldo de cultivo producido.

3.1.1 Contenido nutritivo estimado del Caldo Alternativo para *Azotobacter* spp

En la Tabla 3.1 se muestra el contenido nutritivo estimado de un litro de Caldo Alternativo. Como se puede apreciar, la melaza posee todos los nutrientes esenciales para el crecimiento de los microorganismos.

**Tabla 3. 1 Resumen del Contenido nutritivo estimado para un litro de Caldo Alternativo.
Tomado de los análisis químicos realizados en la melaza (Anexo B)**

Nutriente	Contenido en gramos
Carbohidratos totales	41.4
Proteínas	1.6
Azúcares reductores	14.616
Nitrógeno Orgánico	0.264
Calcio	0.322
Sodio	0.320
Potasio	0.640
Fósforo	0.046
Magnesio	0.379

3.2 Producción de biofertilizante a escala de laboratorio

3.2.1 Reactivación de las cepas bacterianas

A las 24 horas de incubación de las bacterias en CPM, se observó un cambio en la turbidez del medio. Este cambio se produjo debido al crecimiento bacteriano que indicó la reactivación de las bacterias. En este período no se observó contaminación después de haber realizado las tinciones gram correspondientes.

3.2.2 Obtención del preinóculo

Para determinar el tiempo de incubación necesario para obtener preinóculos en fase exponencial se evaluó el crecimiento bacteriano tanto en el medio químico (CPM) como en el medio natural melaza (CA). Obteniéndose los siguientes resultados:

Como se muestra en la figura 3.1, en el medio químico (CPM) la fase exponencial inició a las 6 horas de incubación y terminó a las 18 horas alcanzando una concentración de 5.094 gramos de biomasa por litro de cultivo.

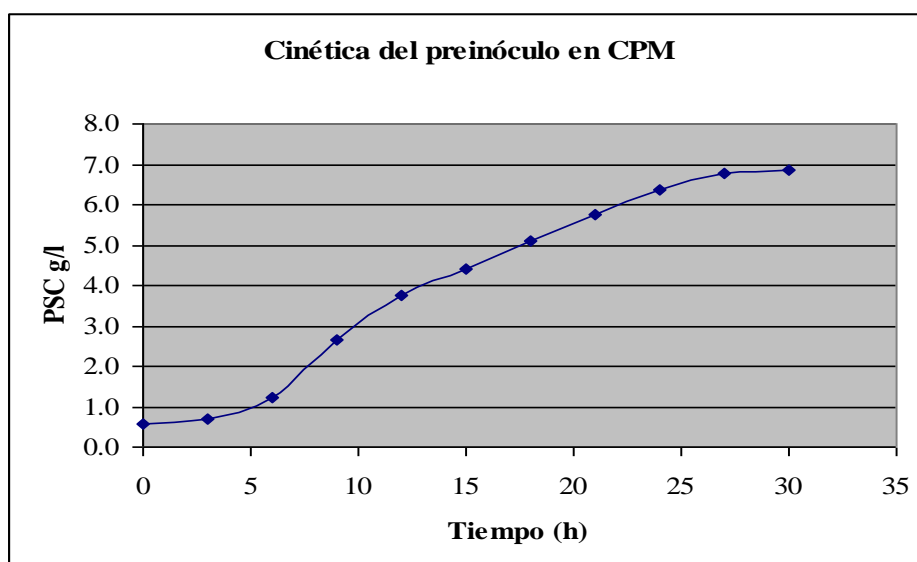


Figura 3.1 Curva de crecimiento de *Azotobacter* spp en CPM durante la fase de preinóculo (Cristina Echeverría; Quito, septiembre 2006)

En la Tabla 3.2 se detallan los resultados obtenidos durante la incubación del preinóculo en CPM. Como se puede apreciar, a las 18 horas de incubación se alcanzó una concentración de 11×10^{10} UFC/l cumpliéndose con los requisitos de concentración del preinóculo planteados en la metodología. Estos resultados indican que el tiempo óptimo de incubación en el cual el preinóculo alcanza su grado máximo de desarrollo exponencial es de 18 horas para el CPM.

Tabla 3.2 Crecimiento de *Azotobacter* spp en CPM durante la fase de preinóculo

Tiempo incubación (h)	PSC g/l	UFC g/ml
0	0.584	9.6E+09
3	0.676	1.2E+10
6	1.242	2.5E+10
9	2.645	5.7E+10
12	3.771	8.2E+10
15	4.405	9.7E+10
18	5.094	1.1E+11
21	5.768	1.3E+11
24	6.377	1.4E+11
27	6.757	1.5E+11
30	6.854	1.5E+11

Como se observa en la figura 3.2 en el medio natural (CA) la fase exponencial se inició a las 12 horas de incubación y terminó a las 27 horas alcanzando una concentración de 4.720 gramos de biomasa por litro de cultivo.

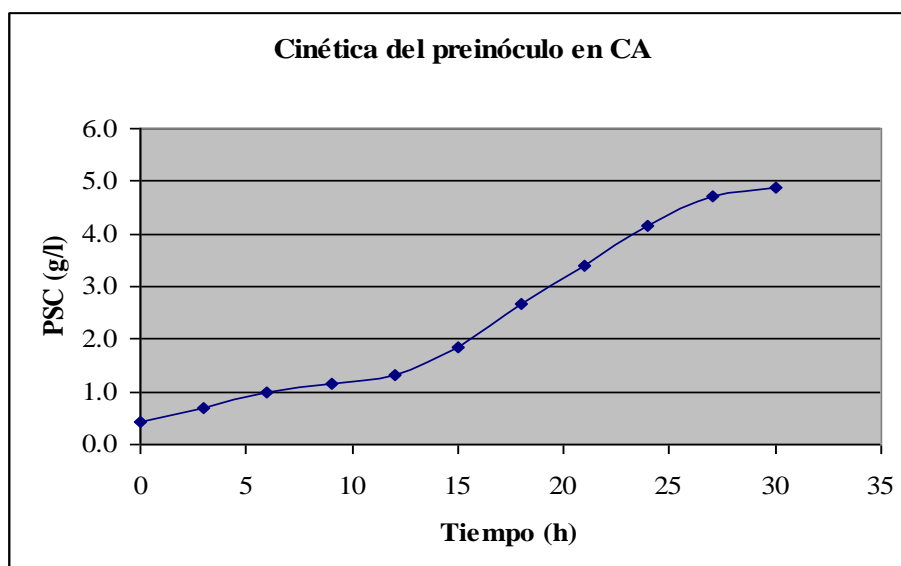


Figura 3.2 Curva de crecimiento de *Azotobacter* spp en CA durante la fase de preinóculo (Crisitna Echeverría; Quito septiembre 2006)

En la Tabla 3.3 se detallan los resultados obtenidos durante la incubación del preinóculo en CA. A las 27 horas de incubación se alcanza una concentración de

10x10¹⁰ UFC/ml cumpliéndose al igual que en el caso anterior, con los requisitos del preinóculo planteados en la metodología.

Tabla 3. 3 Crecimiento de *Azotobacter* spp en CA durante la fase de preinóculo

Tiempo de incubación (h)	PSC g/l	UFC/ml
0	0.430	6.0E+09
3	0.680	1.2E+10
6	0.990	1.9E+10
9	1.160	2.3E+10
12	1.310	2.7E+10
15	1.860	3.9E+10
18	2.680	5.8E+10
21	3.390	7.4E+10
24	4.140	9.1E+10
27	4.720	1.0E+11
30	4.888	1.1E+11

Estos resultados indican que el tiempo de incubación óptimo para el preinóculo en el CA es de 27 horas.

3.2.3 Fermentación discontinua.

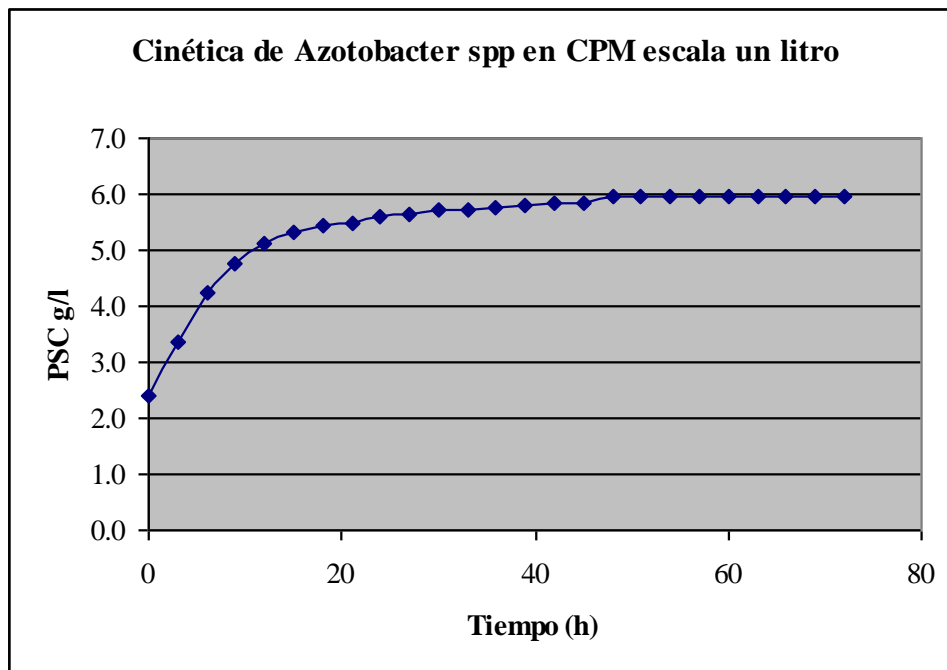
Al finalizar la fermentación discontinua se obtuvieron inóculos con una concentración promedio de 11x10¹⁰ UFC/ml. Durante este período no se observó contaminación significativa.

3.3 Evaluación del crecimiento bacteriano

3.3.1 Concentración de biomasa

En la Tabla 3.4 (pg.35) se muestran los resultados obtenidos durante el crecimiento de *Azotobacter* spp en CPM a escala de laboratorio. Como se puede observar, de cada valor de absorbancia medido experimentalmente se calculó el PSC en g/l. Este cálculo fue realizado a partir de la curva de calibración que se muestra en el

Anexo D. A partir de los valores obtenidos se calculó la media aritmética, con la cual se construyó la curva de crecimiento bacteriano versus el tiempo (Figura 3.3)



**Figura 3. 3 Curva de Crecimiento de *Azotobacter* spp en Caldo Pikovskaya modificado a escala de laboratorio
(Cristina Echeverría; Quito, octubre 2006)**

Tabla 3. 4 Crecimiento de *Azotobacter* spp en CPM a escala de laboratorio

Hora	Obs. 1		Obs. 2		Obs. 3		\bar{X}	UFC/ml	pH
	ABS 540nm	PSC g/l	ABS 540nm	PSC g/l	ABS 540nm	PSC g/l			
0	0.862	2.779	0.509	1.698	0.851	2.746	2.408	5.12E+10	7.040
3	1.199	3.811	0.783	2.537	1.156	3.679	3.343	7.26E+10	7.030
6	1.403	4.436	1.165	3.707	1.449	4.577	4.240	9.31E+10	7.030
9	1.473	4.650	1.440	4.549	1.622	5.106	4.768	1.05E+11	7.030
12	1.529	4.821	1.620	5.100	1.740	5.468	5.130	1.13E+11	7.030
15	1.547	4.877	1.720	5.406	1.799	5.648	5.310	1.18E+11	7.030
18	1.587	4.999	1.762	5.535	1.840	5.774	5.436	1.20E+11	7.020
21	1.590	5.008	1.781	5.593	1.851	5.807	5.470	1.21E+11	7.010
24	1.645	5.177	1.801	5.654	1.888	5.921	5.584	1.24E+11	7.000
27	1.657	5.213	1.825	5.728	1.906	5.976	5.639	1.25E+11	6.970
30	1.669	5.250	1.853	5.814	1.926	6.037	5.700	1.27E+11	6.940
33	1.673	5.262	1.869	5.863	1.936	6.068	5.731	1.27E+11	6.940
36	1.675	5.269	1.879	5.893	1.942	6.086	5.749	1.28E+11	6.930
39	1.684	5.296	1.893	5.936	1.954	6.123	5.785	1.28E+11	6.930
42	1.688	5.308	1.915	6.003	1.967	6.163	5.825	1.29E+11	6.920
45	1.676	5.272	1.929	6.046	1.968	6.166	5.828	1.29E+11	6.910
48	1.754	5.510	1.938	6.074	2.011	6.297	5.961	1.32E+11	6.890
51	1.749	5.495	1.940	6.080	2.010	6.294	5.956	1.32E+11	6.880
54	1.745	5.483	1.945	6.095	2.010	6.294	5.957	1.32E+11	6.870
57	1.739	5.464	1.949	6.107	2.009	6.291	5.954	1.32E+11	6.840
60	1.728	5.431	1.951	6.114	2.005	6.279	5.941	1.32E+11	6.820
63	1.733	5.446	1.951	6.114	2.007	6.285	5.948	1.32E+11	6.810
66	1.738	5.461	1.955	6.126	2.012	6.300	5.963	1.33E+11	6.790
69	1.735	5.452	1.960	6.141	2.013	6.303	5.966	1.33E+11	6.810
72	1.737	5.458	1.967	6.163	2.017	6.316	5.979	1.33E+11	6.770

Como se observa en la figura 3.3 (pg.34), se alcanzó el grado máximo de desarrollo exponencial a las 15 horas de incubación obteniéndose una concentración de 5.310 gramos de biomasa por litro de cultivo. Sin embargo, según los datos de la tabla 3.4 a las 9 horas de incubación se alcanzó la concentración bacteriana mínima requerida para obtener un inoculante biológico (10×10^{10} UFC/l). Esto significa que el tiempo de fermentación mínimo requerido para producir un litro de biofertilizante utilizando el CPM como medio de cultivo es de 9 horas y el tiempo óptimo para conseguir el máximo desarrollo exponencial es de 15 horas.

Una vez graficada la curva de crecimiento (Figura 3.3), se identificaron los puntos pertenecientes a la fase exponencial y con ellos se realizó una regresión lineal para obtener la ecuación de la línea de tendencia cuya pendiente es igual a la velocidad de crecimiento (Figura 3.4).

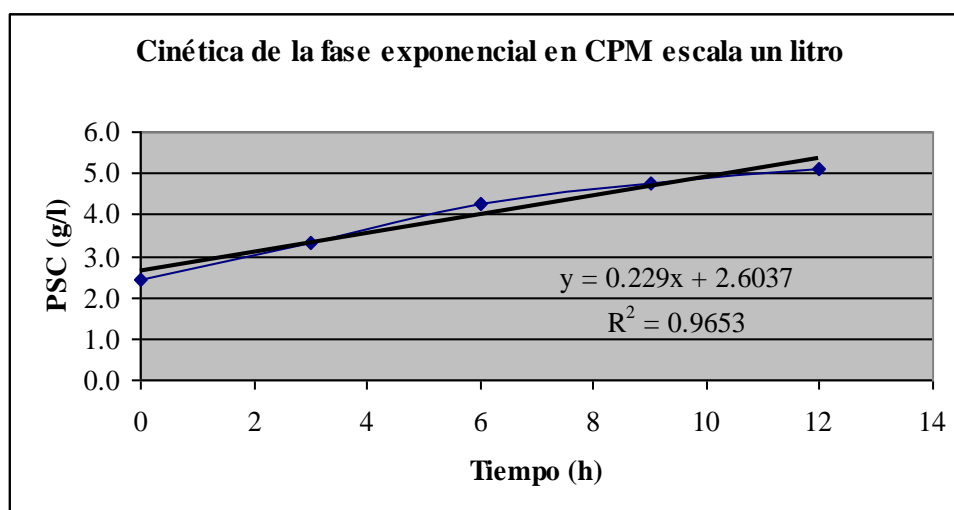


Figura 3.4 Regresión lineal de la fase exponencial en CPM a escala de laboratorio (Cristina, Quito; octubre 2006)

A partir de la velocidad obtenida se calcularon otros parámetros cinéticos: el tiempo de duplicación o tiempo necesario para duplicar la concentración inicial de biomasa y el número de veces en que esta fue duplicada durante la fase exponencial (Tabla 3.5).

Como se muestra en la tabla 3.5, el tiempo de duración de la fase exponencial fue de 12 horas con una velocidad de crecimiento bacteriano de 0.229 g/lh. Durante esta etapa, la concentración de biomasa fue duplicada aproximadamente cada 3.026

horas lo que indicó que al finalizar la fase exponencial la concentración de biomasa fue duplicada hasta cuatro veces.

Tabla 3.5 Parámetros cinéticos durante la fase exponencial en CPM a escala un litro

Parámetro	CPM	Unidad	Fórmula
μ	0.229	g/lh	$X = \mu t + X_0$
td	3.026	h	$td = \ln 2 / \mu$
t	12	h	
n	4		$n = t / td$

En la tabla 3.6 (pg.38) se muestran los resultados obtenidos durante la producción del biofertilizante en CA, como se puede apreciar, a partir de los pesos secos obtenidos experimentalmente se calculó la media aritmética con la cual se construyó la curva de crecimiento bacteriano que se observa en la Figura 3.5.

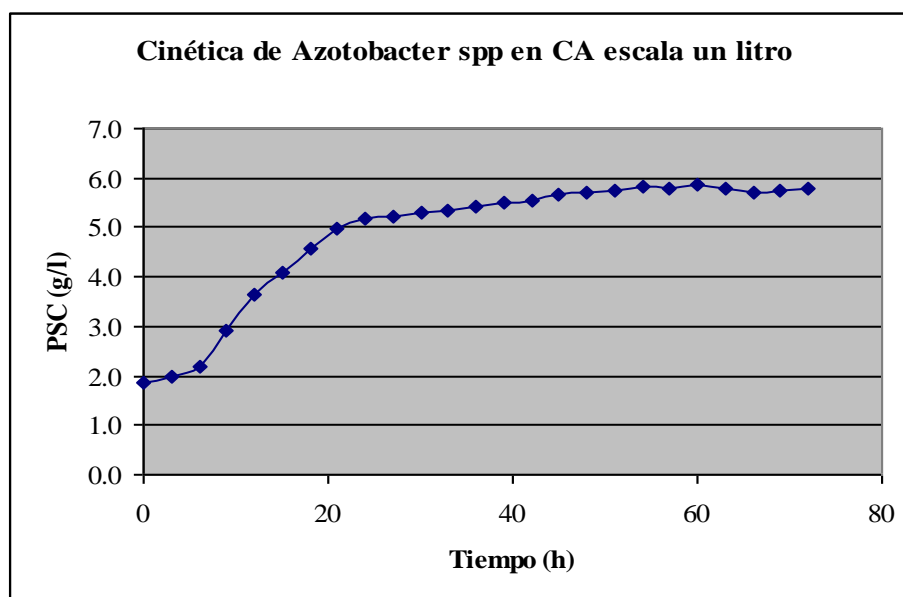


Figura 3.5 Curva de Crecimiento de *Azotobacter* spp en Caldo alternativo Melaza a escala de laboratorio

Como se puede apreciar en la figura 3.5, a las 24 horas de incubación se produjo el máximo desarrollo exponencial alcanzándose una concentración de biomasa de 5.195 gramos por litro de cultivo. Sin embargo, de acuerdo a los datos presentados en la tabla 3.6 a las 18 horas de incubación se alcanzó la concentración mínima requerida para obtener el biofertilizante. De esta manera el tiempo mínimo requerido para producir un

litro biofertilizante utilizando el CA como sustrato es de 18 horas y el tiempo óptimo para alcanzar el máximo desarrollo exponencial es de 24 horas.

Tabla 3. 6 Crecimiento de *Azotobacter* spp en CA a escala de laboratorio

Hora	PSC g/l				UFC/ml	pH
	Obs.1	Obs. 2	Obs. 3	\bar{X}		
0	1.740	2.090	1.780	1.870	3.90E+10	7.040
3	1.850	2.200	1.890	1.980	4.15E+10	7.030
6	2.070	2.250	2.280	2.200	4.65E+10	7.030
9	2.800	2.980	3.010	2.930	6.32E+10	7.030
12	3.530	3.710	3.740	3.660	7.99E+10	7.030
15	3.960	4.140	4.170	4.090	8.97E+10	7.030
18	4.440	4.620	4.650	4.570	1.01E+11	7.020
21	4.610	5.100	5.210	4.973	1.10E+11	7.020
24	4.950	5.214	5.420	5.195	1.15E+11	7.020
27	5.040	5.230	5.377	5.216	1.15E+11	7.020
30	5.120	5.353	5.460	5.311	1.18E+11	7.010
33	5.110	5.400	5.510	5.340	1.18E+11	7.010
36	5.200	5.490	5.600	5.430	1.20E+11	7.010
39	5.230	5.510	5.720	5.487	1.22E+11	7.000
42	5.420	5.560	5.670	5.550	1.23E+11	7.000
45	5.140	5.430	6.440	5.670	1.26E+11	7.000
48	5.132	5.510	6.495	5.712	1.27E+11	6.990
51	5.220	5.560	6.420	5.733	1.27E+11	6.980
54	5.300	5.710	6.480	5.830	1.29E+11	6.980
57	5.310	5.690	6.390	5.797	1.29E+11	6.960
60	5.350	5.720	6.473	5.848	1.30E+11	6.950
63	5.320	5.620	6.450	5.797	1.29E+11	6.950
66	5.363	5.440	6.290	5.698	1.26E+11	6.940
69	5.311	5.610	6.270	5.730	1.27E+11	6.940
72	5.280	5.640	6.379	5.766	1.28E+11	6.940

Al igual que en el caso anterior, una vez graficada la curva de crecimiento, se identificaron los puntos pertenecientes a la fase exponencial y con ellos se realizó una regresión lineal para obtener la ecuación de la línea de tendencia cuya pendiente es igual a la velocidad de crecimiento (Figura 3.6).

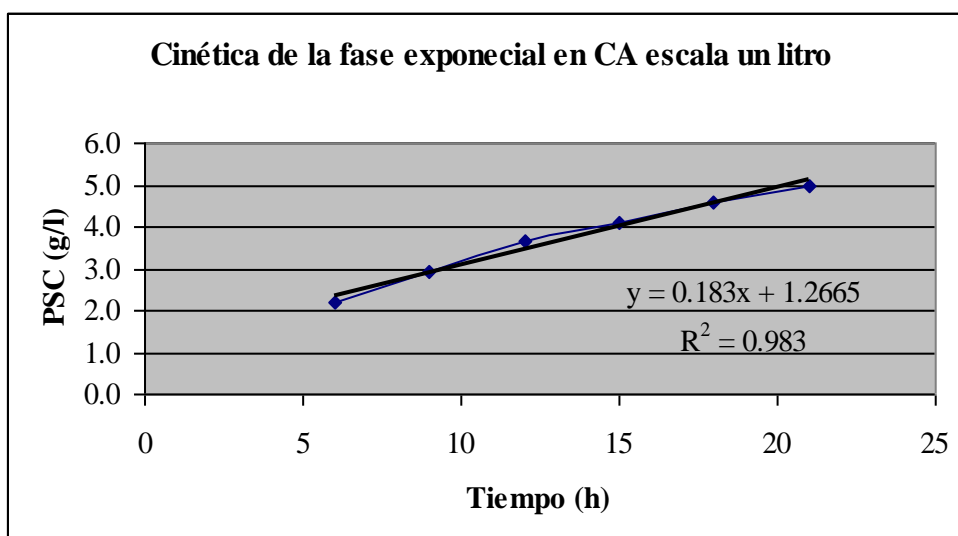


Figura 3.6 Regresión lineal de la fase exponencial durante el crecimiento de *Azotobacter* spp en caldo alternativo melaza (Cristina Echeverría; Quito, Octubre 2006)

Como se muestra en la Tabla 3.7, el tiempo de duración de la fase exponencial fue de 15 horas con una velocidad de crecimiento bacteriano de 0.183 g/lh. Durante esta etapa, la concentración de biomasa fue duplicada aproximadamente cada 3.78 horas lo que indicó que al finalizar la fase exponencial la concentración de biomasa fue duplicada hasta cuatro veces.

Tabla 3.7 Parámetros cinéticos durante la fase exponencial en CA escala un litro

Parámetro	CA	Unidad	Fórmula
μ	0.183	g/lh	$X = \mu t + X_0$
td	3.78	h	$td = \ln 2 / \mu$
t	15	h	
n	4		$n = t / td$

Como se puede observar después de la fase exponencial tanto en el medio químico (CPM) como en el medio natural (CA) se produce un aumento en la concentración de biomasa; sin embargo, la velocidad de crecimiento disminuye considerablemente. Esta disminución nos indica que las bacterias ya no se encuentran en su óptimo de actividad metabólica por lo que el aumento de biomasa durante esta etapa es despreciable.

3.3.2 Evaluación del consumo de glucosa en CPM

Como se indica en la tabla 3.8, a partir de la absorbancia medida experimentalmente se calculó la concentración de glucosa residual utilizando para ello la curva de calibración que se muestra en el Anexo E. A partir de estos datos se calculó la velocidad de consumo de sustrato (S) y el rendimiento (Ys) obteniéndose un rendimiento promedio de 1.476 g/g. La velocidad de crecimiento (μ) se calculó a partir de los datos obtenidos en la evaluación del crecimiento bacteriano. Como se puede observar, a las 15 horas que termina la fase exponencial la concentración de sustrato se redujo prácticamente a la mitad.

Tabla 3. 8 Consumo de sustrato durante el crecimiento de *Azotobacter* spp en CPM

Hora	ABS 546 nm	Glucosa g/l	Ys g/g	μ	S
0	2.140	4.734	0.000		
3	1.618	3.612	0.833	0.312	0.374
6	1.550	3.465	1.444	0.305	0.211
9	1.517	3.395	1.762	0.262	0.149
12	1.295	2.917	1.498	0.227	0.151
15	1.231	2.780	1.485	0.194	0.130
18	1.179	2.668	1.466	0.168	0.115
21	0.959	2.195	1.206	0.146	0.121
24	0.952	2.180	1.243	0.132	0.106
27	0.948	2.171	1.261	0.120	0.095
30	0.803	1.859	1.145	0.110	0.096
33	0.784	1.819	1.140	0.101	0.088
36	0.767	1.782	1.132	0.093	0.082
39	0.601	1.425	1.021	0.087	0.085
42	0.551	1.318	1.000	0.081	0.081
45	0.547	1.309	0.999	0.076	0.076
48	0.343	0.870	0.920	0.074	0.080
51	0.340	0.864	0.917	0.070	0.076
54	0.343	0.870	0.919	0.066	0.072
57	0.336	0.855	0.914	0.062	0.068
60	0.348	0.881	0.917	0.059	0.064
63	0.283	0.741	0.887	0.056	0.063
66	0.296	0.769	0.897	0.054	0.060
69	0.225	0.617	0.864	0.052	0.060
72	0.211	0.587	0.861	0.050	0.058

En la Figura 3.7 se muestra el consumo de sustrato y el crecimiento bacteriano durante la fermentación. Como se puede apreciar, la disminución de glucosa es mayor durante la fase exponencial del crecimiento bacteriano. Es decir, la fase en la cual se produce el mayor crecimiento bacteriano.

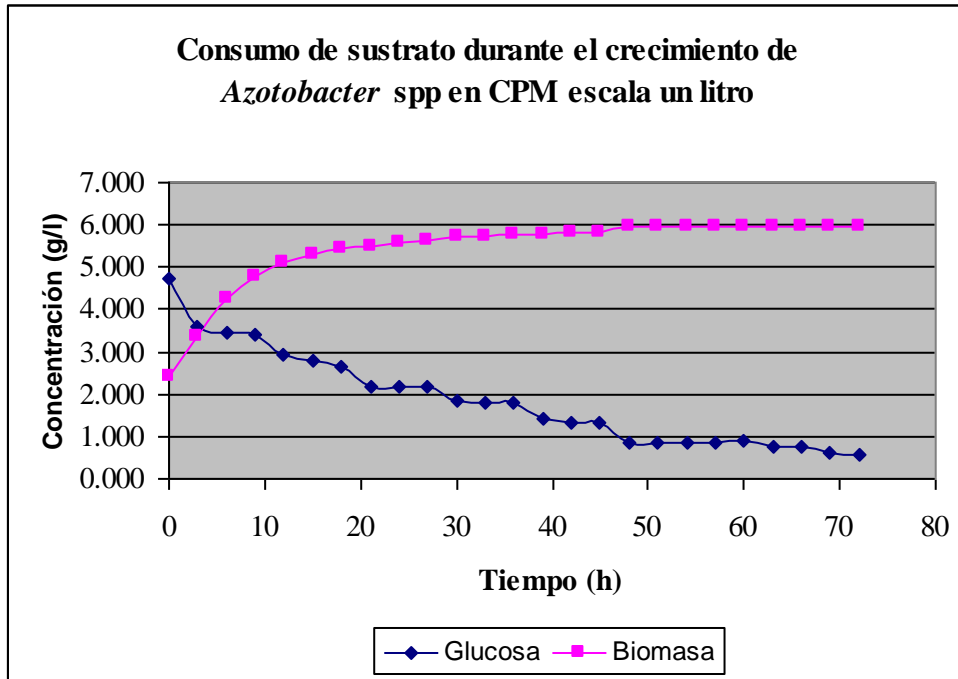


Figura 3.7 Consumo de glucosa durante el crecimiento de *Azotobacter* spp en CPM (Cristina Echeverría; Quito, octubre 2006)

Para obtener la velocidad máxima de crecimiento y la constante de sustrato, se realizó la transformación lineal de Lineweaver-Burk utilizando la ecuación de Monod que es homóloga a la ecuación de Michaelis-Menten (figura 3.8).

$$\frac{1}{\mu} = \frac{K_s}{\mu_{\max}} * \frac{1}{S} + \frac{1}{\mu_{\max}}$$

Según los resultados obtenidos la velocidad máxima fue de 0.287 g/lh con una constante de afinidad de sustrato de 0.203 g/l. Estos resultados indican que la velocidad de crecimiento durante la fase exponencial tiende a ser igual a la velocidad máxima. La constante de sustrato refleja el grado de afinidad de las bacterias por el medio de cultivo utilizado, en este caso el CPM.

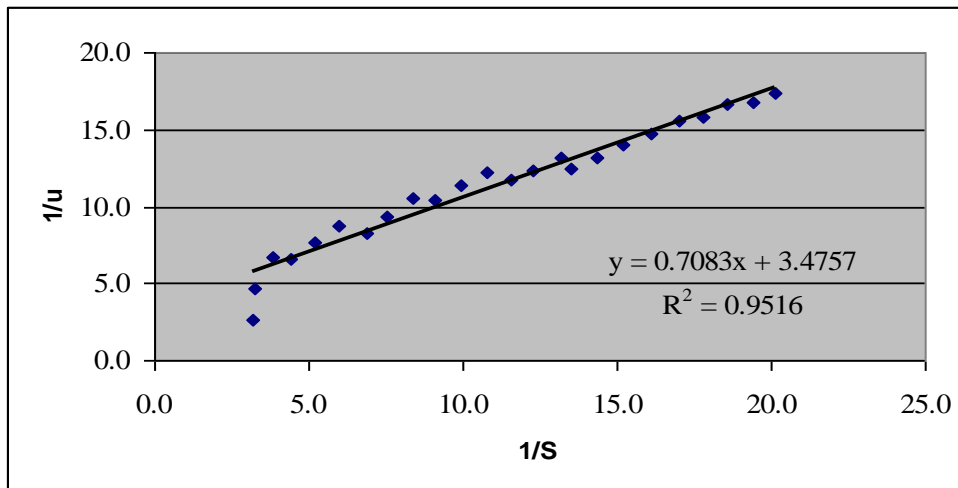


Figura 3. 8 Transformación lineal de Lineweaver-Burk para el consumo de glucosa durante el crecimiento de *Azotobacter* spp en CPM (Cristina Echeverría; Quito, octubre 2006)

3.3.3 Variación de pH

Como se observa en la Figura 3.9 la fermentación en el CPM inició a un pH de 7.04 y se produjo un descenso hasta 6.7. Esta variación se encontró dentro de un rango aceptable para el crecimiento de *Azotobacter* spp.

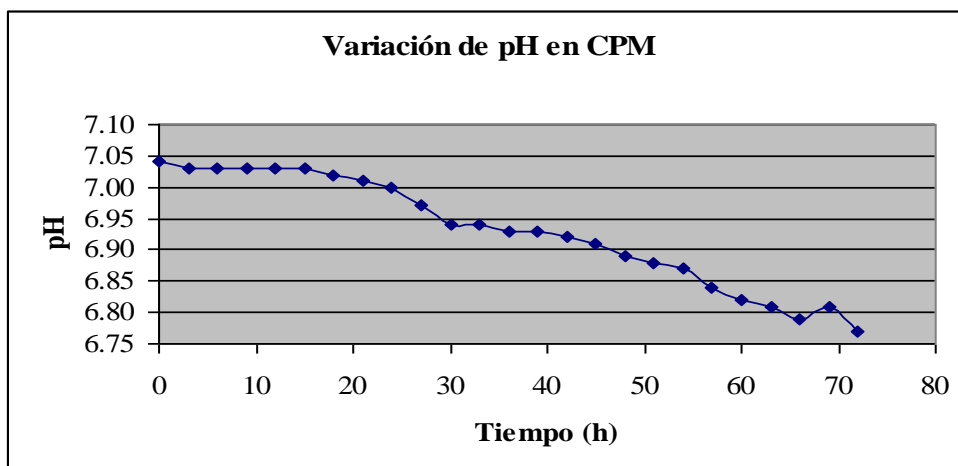


Figura 3. 9 Variación de pH durante el crecimiento de *Azotobacter* spp en CPM (Cristina Echeverría; Quito, octubre 2006)

Como se observa en la figura 3.10 la fermentación en el CA inició a un pH de 7.04 y se produjo un descenso hasta 6.94. Esta variación se encontró dentro de un rango aceptable, para el crecimiento de *Azotobacter* spp.

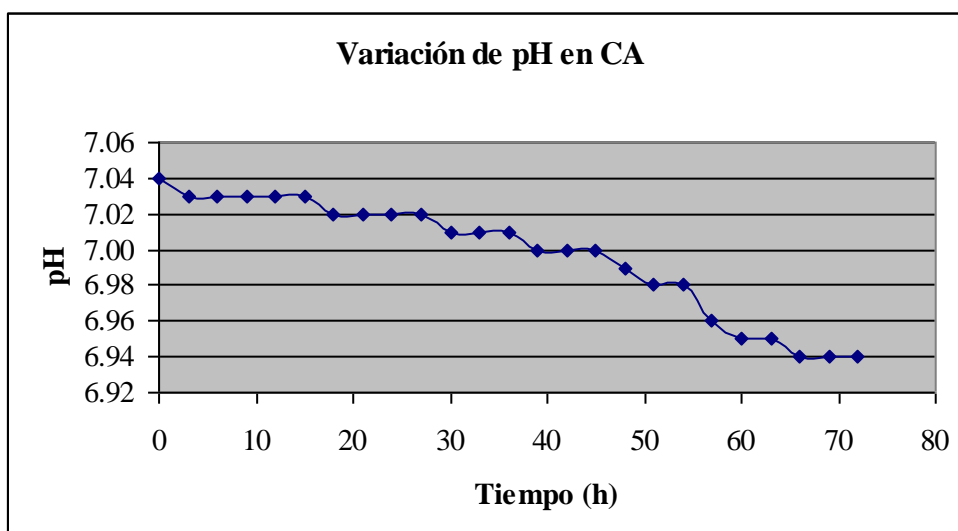


Figura 3. 10 Variación de pH durante el crecimiento de *Azotobacter* spp en CA (Cristina Echeverría; Quito, octubre 2006)

Como se puede observar en las Figuras 3.9 y 3.10 la variación de pH fue mínima a escala de laboratorio. Durante la producción del biofertilizante a escala diez litros se logró mantener ésta variabilidad de pH utilizando un buffer en el medio.

3.2.4 Variación de la temperatura en el caldo de cultivo

La producción del biofertilizante fue realizada a una temperatura ambiente de 28° C que corresponde a la temperatura promedio del cuarto de incubación; sin embargo el caldo de cultivo alcanzo temperaturas comprendidas entre 12 y 15 °C tanto para escala de laboratorio como a escala diez litros. Estas temperaturas corresponden a la temperatura real en la cual crecen los microorganismos.

3.3 producción de biofertilizante a escala diez litros

Durante la producción del biofertilizante a escala diez litros se alcanzó un 70% del rendimiento obtenido a nivel de laboratorio tanto en el medio químico (CPM) como en el medio natural (CA). Los resultados obtenidos fueron los siguientes:

Como se muestra en la Figura 3.11 el máximo desarrollo exponencial durante la fermentación en CPM a escala diez litros se produjo a las 18 horas de incubación alcanzándose una concentración de biomasa de 5.35 gramos por litro de cultivo. Sin embargo de acuerdo con los resultados presentados en la tabla 3.9 (pg.45) la concentración bacteriana mínima requerida para obtener un biofertilizante se alcanzó a las 12 horas de incubación.

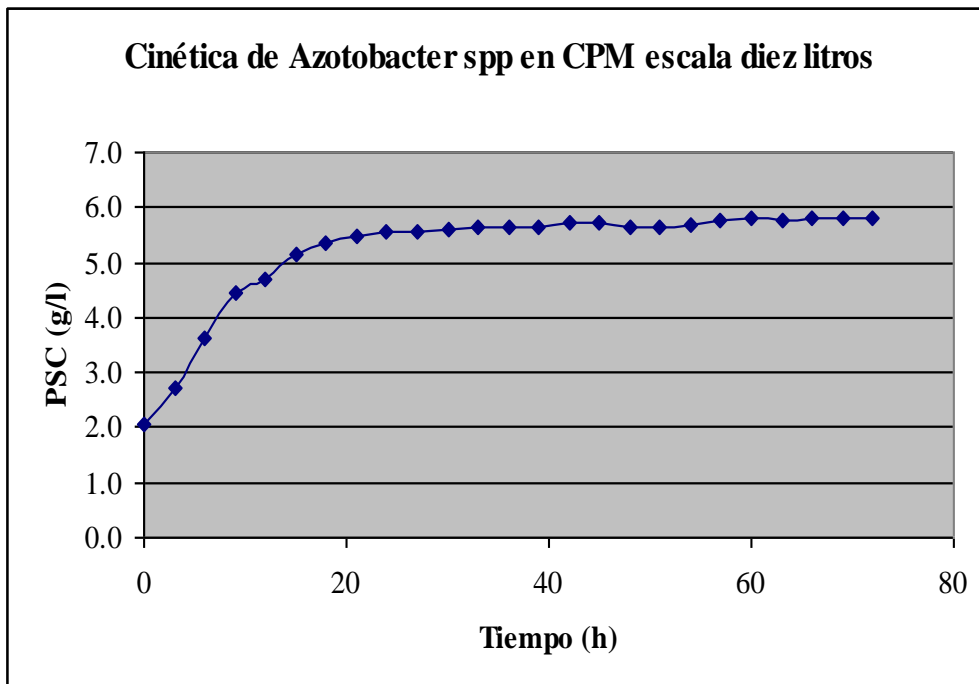


Figura 3. 11 Curva de crecimiento de Azotobacter spp en CPM a escala diez litros (Cristina Echeverría; Quito, octubre 2006)

Estos resultados indican que el tiempo mínimo de incubación para obtener diez litros de biofertilizante en CPM es de 12 horas y el tiempo óptimo de fermentación para obtener, el máximo desarrollo exponencial es de 18 horas.

Finalmente se obtuvo un biofertilizante con una concentración de 12×10^{10} UFC/ml utilizando el CPM como medio de cultivo.

Tabla 3. 9 Crecimiento de *Azotobacter* spp en CMP escala diez litros

Hora	CPM		
	ABS 540nm	PSC g/l	UFC/l
0	0.620	2.038	4.28E+10
3	0.842	2.718	5.83E+10
6	1.142	3.637	7.93E+10
9	1.403	4.436	9.76E+10
12	1.484	4.684	1.03E+11
15	1.632	5.137	1.14E+11
18	1.703	5.354	1.19E+11
21	1.744	5.480	1.21E+11
24	1.764	5.541	1.23E+11
27	1.768	5.553	1.23E+11
30	1.781	5.593	1.24E+11
33	1.792	5.627	1.25E+11
36	1.794	5.633	1.25E+11
39	1.798	5.645	1.25E+11
42	1.821	5.716	1.27E+11
45	1.824	5.725	1.27E+11
48	1.792	5.627	1.25E+11
51	1.792	5.627	1.25E+11
54	1.814	5.694	1.26E+11
57	1.832	5.749	1.28E+11
60	1.848	5.798	1.29E+11
63	1.841	5.777	1.28E+11
66	1.851	5.807	1.29E+11
69	1.848	5.798	1.29E+11
72	1.850	5.804	1.29E+11

En la Figura 3.12, se muestra la línea de tendencia obtenida con los puntos pertenecientes a la fase exponencial durante la producción del biofertilizante en CPM a escala diez litros. Como se puede apreciar, la pendiente de la recta es igual a la velocidad de crecimiento bacteriano durante esta fase.

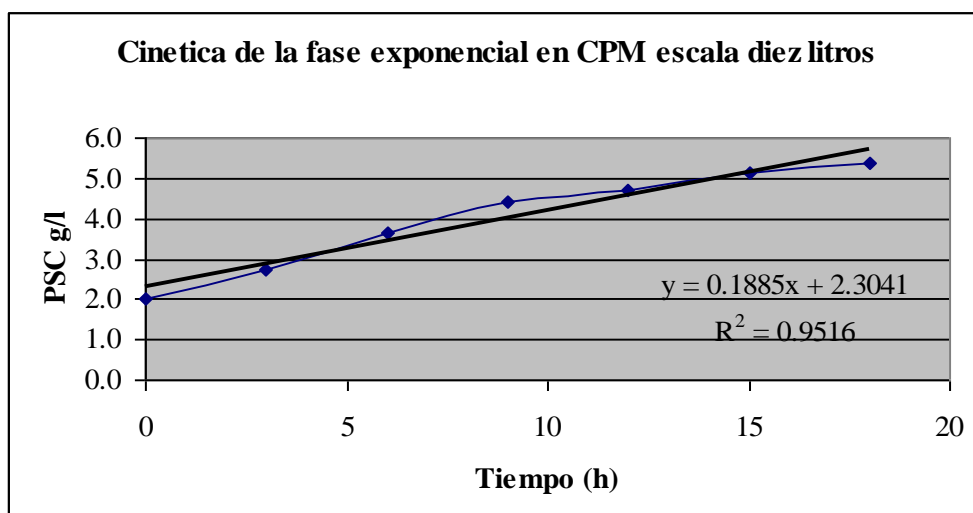


Figura 3. 12 Fase exponencial en CPM escala diez litros (Cristina Echeverría; Quito, octubre 2006)

En la Tabla 3.10 se resumen los parámetros cinéticos obtenidos durante la fase exponencial en el CPM. Como se puede apreciar, el tiempo de duración esta fase fue de 15 horas con una velocidad de crecimiento bacteriano de 0.1885 g/lh. Durante esta etapa, la concentración de biomasa fue duplicada aproximadamente cada 3.67 horas lo que indicó que al finalizar la fase exponencial la concentración de biomasa fue duplicada hasta cinco veces.

Tabla 3. 10 Parámetros cinéticos durante la fase exponencial en CPM escala diez litros

Parámetro	CPM	Unidad	Fórmula
μ	0.1885	g/lh	$X = \mu t + X_0$
Td	3.67	h	$td = \ln 2 / \mu$
T	18	h	
N	5		$n = t / td$

En la Tabla 3.11 se muestran los resultados obtenidos durante la producción de *Azotobacter* spp en CA escala diez litros. Como se puede apreciar, a las 24 horas de fermentación se alcanza la concentración requerida del producto (10×10^{10} UFC/ml). A esta hora de fermentación coincide también el tiempo de máximo desarrollo exponencial.

Tabla 3. 11 Crecimiento de *Azotobacter* spp en CA escala diez litros

Hora	CA	
	PSC g/l	UFC/l
0	2.247	4.76E+10
3	2.324	4.93E+10
6	2.478	5.29E+10
9	2.989	6.45E+10
12	3.500	7.62E+10
15	3.801	8.31E+10
18	4.137	9.08E+10
21	4.419	9.72E+10
24	4.575	1.01E+11
27	4.589	1.01E+11
30	4.656	1.03E+11
33	4.676	1.03E+11
36	4.739	1.05E+11
39	4.779	1.05E+11
42	4.823	1.06E+11
45	4.907	1.08E+11
48	4.936	1.09E+11
51	4.951	1.09E+11
54	5.019	1.11E+11
57	4.996	1.10E+11
60	5.032	1.11E+11
63	5.090	1.13E+11
66	5.120	1.13E+11
69	5.130	1.13E+11
72	5.110	1.13E+11

En la Figura 3.13 se muestra la curva de crecimiento durante la fermentación de *Azotobacter* spp en CA a escala diez litros. Como se puede apreciar, el máximo desarrollo exponencial se produjo a las 24 horas de incubación alcanzándose una concentración de biomasa de 4.75 gramos por litro de cultivo producido de acuerdo a los resultados presentados en la tabla 3.11. Previa a la fase exponencial, se puede observar también que existe una fase de adaptación de 6 horas.

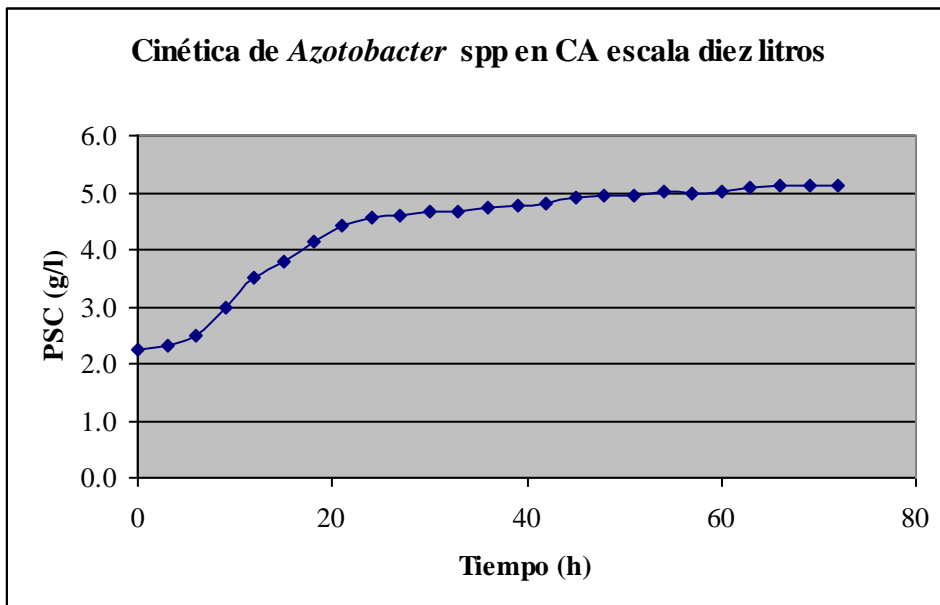


Figura 3. 13 Crecimiento de *Azotobacter* spp en CA escala diez litros (Cristina Echeverría; Quito, octubre 2006)

Al igual que en el caso anterior, una vez graficada la curva de crecimiento, se identificaron los puntos pertenecientes a la fase exponencial y con ellos se realizó una regresión lineal para obtener la ecuación de la línea de tendencia cuya pendiente es igual a la velocidad de crecimiento (Figura 3.14).

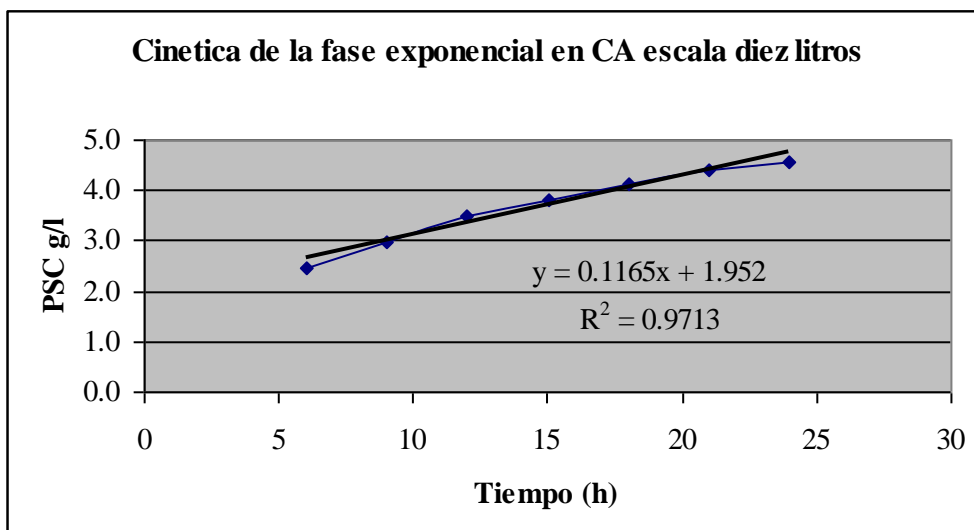


Figura 3. 14 Crecimiento de *Azotobacter* spp durante la fase exponencial en CA escala diez litros (Cristina Echeverría; Quito, octubre 2006)

Como se muestra en la Tabla 3.12, el tiempo de duración de la fase exponencial fue de 18 horas con una velocidad de crecimiento bacteriano de 0.116 g/lh. Durante esta etapa, la concentración de biomasa fue duplicada aproximadamente cada 5.94 horas lo que indicó que al finalizar la fase exponencial la concentración de biomasa fue duplicada hasta 3 veces. Hay que considerar que el crecimiento no inicia en fase exponencial.

Tabla 3. 12 Parámetros cinéticos durante la fase exponencial en CA escala diez litros

Parámetro	CA	Unidad	Fórmula
μ	0.1165	g/lh	$X = \mu t + X_0$
Td	5.94	h	$t_d = \ln 2 / \mu$
T	18	h	
N	3		$n = t / t_d$

3.4 Viabilidad del producto

Como se muestra en la Tabla 3.13 (pg. 50), el producto terminado fue evaluado durante un período de dos meses y medio (11 semanas) que es el tiempo mínimo requerido por la empresa auspiciante. Se analizaron 3 parámetros: la población bacteriana, la actividad y la presencia de contaminantes. Durante la evaluación, se puede apreciar que la población bacteriana se mantuvo abundante durante todo el tiempo que duró la evaluación del producto.

Tabla 3. 13 Evaluación del tiempo de vida útil del producto

Fecha	Semanas	Población UFC/ml		Contaminación		Observaciones
		CPM	CA	CPM	CA	
15/08/2006	0	1.3x10 ¹¹	1.1x10 ¹¹	-	-	
22/08/2006	1	1.2x10 ¹¹	1.1x10 ¹¹	-	-	Formación de quistes
29/08/2006	2	1.2x10 ¹¹	1.1x10 ¹¹	-	-	
05/09/2006	3	1.1x10 ¹¹	1.0x10 ¹¹	-	-	
12/09/2006	4	1.1x10 ¹¹	1.0x10 ¹¹	-	-	
19/09/2006	5	1.1x10 ¹¹	1.0x10 ¹¹	-	-	
26/09/2006	6	1.0x10 ¹¹	1.0x10 ¹¹	-	-	
03/10/2006	7	1.0x10 ¹¹	1.0x10 ¹¹	-	-	
10/10/2006	8	1.0x10 ¹¹	1.0x10 ¹¹	-	-	
17/10/2006	9	9.9x10 ¹⁰	1.0x10 ¹¹	-	-	
24/10/2006	10	9.9x10 ¹⁰	9.9x10 ¹⁰	-	-	
31/10/2006	11	9.9x10 ¹⁰	9.8x10 ¹⁰	-	-	

CAPÍTULO 4. ANÁLISIS DE RESULTADOS

4.1 Formulación del Caldo Alternativo

La melaza, dada a la gran riqueza nutritiva que posee (Tabla 3.1), resultó ser un buen medio de cultivo alternativo para el crecimiento de *Azotobacter* spp. Sin embargo, hay que considerar que su composición nutricional va a variar de acuerdo al origen o procedencia de la misma siendo recomendable contar con un solo proveedor y seleccionar si es posible la melaza que posea las mejores características nutritivas (Ivanova, 1995; Pérez, 1997).

4.2 Producción de Biofertilizante a escala de laboratorio

4.2.1 Reactivación de cepas

A pesar de que en la bibliografía se recomienda utilizar un medio sólido y selectivo para la reactivación de bacterias con el objetivo minimizar el peligro de contaminación (Gaitán y García, 1998), se demostró que es posible utilizar un medio líquido no selectivo siempre y cuando se guarden normas estrictas de esterilidad y las cepas sean utilizadas inmediatamente después de su reactivación.

4.2.2 Obtención del preinóculo

Cómo se muestra en las tablas 3.2 y 3.3, ambos preinóculos alcanzaron concentraciones del orden de 10^9 - 10^{10} células/ml, cumpliendo con los requisitos establecidos en estudios previos (Pérez, 1997).

En las figuras 3.1 y 3.2 se muestra el crecimiento obtenido durante el preinóculo observándose que en el medio natural la fase de latencia fue mucho mayor a la observada en el medio químico. Estos resultados se explican si consideramos que el medio natural es mucho más complejo y es posible que las células necesiten mayor tiempo para sintetizar enzimas que les permitan adaptarse a las condiciones del medio antes de iniciar su crecimiento exponencial (Scragg, 2000).

Como se muestra en las figuras 3.3 y 3.5, con la obtención del preinóculo se logró disminuir la fase lag durante la fermentación acortando el tiempo de duración del proceso. En el caso del medio químico CPM la fase lag desapareció completamente iniciando el crecimiento directamente en fase exponencial (Gaitán & García 1998).

4.2.3 Fermentación discontinua

Los resultados obtenidos en la fermentación discontinua muestran una superioridad del medio químico del 50% para el crecimiento de *Azotobacter* spp, de acuerdo al tiempo requerido para la producción. Sin embargo, en ambos medios de cultivo se logró cumplir con los requisitos del producto tanto en concentración como en tiempo de vida útil.

Hay que considerar que la concentración de biomasa en PSC no puede ser comparada entre ambos cultivos debido a que estos fueron determinados por métodos distintos; lo que podría ocasionar un error de apreciación.

Como se muestra en la figura 4.1, la ventaja del medio natural sobre el medio químico radicó en el costo del proceso productivo (Anexo F) que a nivel de laboratorio resultó ser un 23.93% menor.

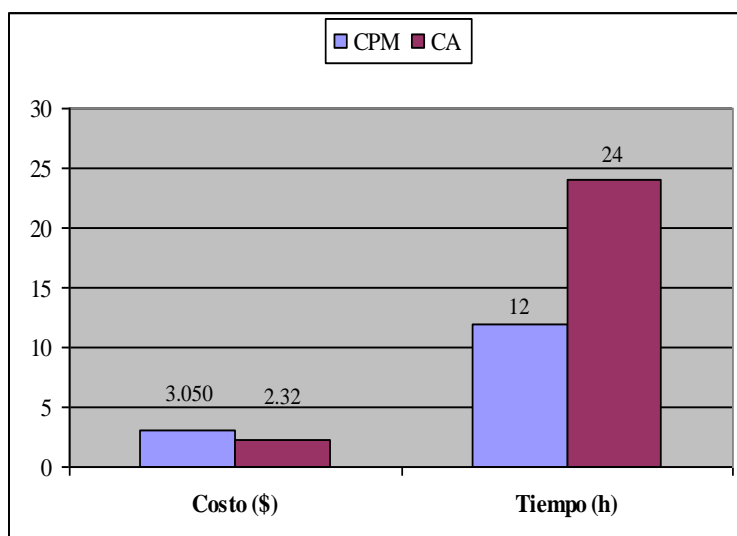


Figura 4. 1 Comparación de costos y tiempo de producción entre el CPM y el CA durante la fermentación discontinua de *Azotobacter* spp a escala de laboratorio

4.3 Evaluación del crecimiento bacteriano

Como se muestra en las figuras 3.3 y 3.5 después de la fase exponencial se produce una desaceleración en el crecimiento bacteriano, sin embargo no se observa una fase estacionaria propiamente dicha ya que se puede apreciar aumento en la concentración de biomasa hasta la hora 72 que finalizó la fermentación. Esta desaceleración indicó que las bacterias ya no se encontraban en su óptimo de actividad metabólica; siendo el aumento de concentración de biomasa despreciable comparado con el tiempo y la energía requeridos (Gaitán & García, 1998).

4.3.1 Concentración de biomasa

En ambos cultivos se obtuvo una concentración bacteriana aproximada de 11×10^{10} UFC/ml, cumpliéndose con los requisitos de concentración del producto. Según el Comité Estatal de Normalización de Cuba (1992), la concentración mínima de *Azotobacter* que se debe inocular al suelo para que actúe como biofertilizante es 10×10^8 células/ml.

4.3.2 Consumo de glucosa en CPM

Cómo se muestra en la figura 3.7, la concentración de glucosa fue disminuyendo con el tiempo; observándose la mayor disminución de sustrato durante la fase de crecimiento exponencial. Esto demuestra que la velocidad de crecimiento está directamente relacionada con la concentración de sustrato (Scragg, 2000).

El rendimiento promedio del crecimiento bacteriano por gramo de sustrato producido muestra la efectividad del medio químico para el crecimiento de *Azotobacter* spp. Esto explica que el valor de la constante de sustrato sea tan pequeño (Pérez, 1997).

Si comparamos la velocidad de crecimiento durante la fase exponencial en CPM y la velocidad máxima obtenida en la evaluación del consumo de sustrato, se comprueba que en fase exponencial la velocidad de crecimiento es aproximadamente igual a la velocidad máxima (Scragg, 2000).

4.3.3 Variación de pH

Como se muestra en las figuras 3.9 y 3.10, Se observó un descenso de pH durante el crecimiento bacteriano tanto en el medio químico CPM como en el medio natural CA. Este descenso fue mayor en el medio químico lo cual era de esperarse si consideramos que es un medio mucho más simple y su consumo mucho más rápido. La variación de pH durante el crecimiento se explica con el cambio en la composición del medio debido a productos formados durante el metabolismo celular (Scragg, 2000).

A pesar de que la variación de pH se mantuvo dentro de un rango aceptable para el crecimiento de *Azotobacter*, es necesario el mantenimiento del pH óptimo durante la fermentación con el objetivo de obtener el mayor rendimiento posible (Gaitán & Garcia, 1998).

4.3.4 Variación de la Temperatura

Como se puede apreciar, según los datos obtenidos, la temperatura del caldo de cultivo corresponde a la mitad de la temperatura ambiental del cuarto de cultivo. Esta temperatura según Scragg (2000), corresponde a la temperatura real a la cual crecen los microorganismos.

4.4 Producción de biofertilizante a escala diez litros

Durante la producción de biofertilizante a escala diez litros se consiguió un rendimiento del 70% de los resultados obtenidos a nivel de laboratorio lo cual demuestra que el escalamiento del proceso fue exitoso; sin embargo se podría mejorar el rendimiento con la adquisición de equipo especializado que permita un mayor control de las condiciones ambientales pH, temperatura, aireación, etc. (Gaitán & García, 1998).

Como se muestra en la figura 3.11, la fase exponencial en el CPM a escala diez litros aumento de 12 a 18 horas, sin embargo, la velocidad de crecimiento disminuyó en un 17.68% aumentando el tiempo de duplicación.

En el caso del CA, figura 3.13, se mantuvo constante el tiempo de duración de la fase exponencial pero la velocidad de crecimiento disminuyó en un 36,33% aumentando 1.5 veces el tiempo de duplicación y disminuyendo el numero de generaciones producido.

A escala diez litros, pese a la disminución del rendimiento, la concentración del producto se mantuvo dentro de los parámetros requeridos del producto. A este nivel de producción se observó una superioridad del 36.8% en el medio químico en cuanto al tiempo requerido pero se observó una disminución del 82.36% en el costo del proceso utilizando el medio natural. (Figura 4.2)

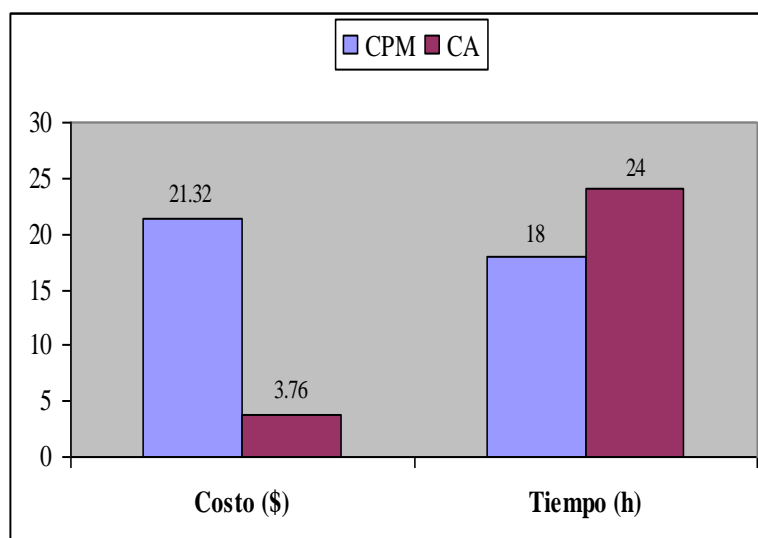


Figura 4. 2 Comparación de costos y tiempo entre el CPM y el CA durante la fermentación discontinua a escala diez litros

4.5 Evaluación del tiempo de vida útil del producto

El producto se conservó durante los dos meses y medio que duró su evaluación tanto en CPM como en CA. De acuerdo a los resultados obtenidos el tiempo de vida útil sería incluso mayor al tiempo de evaluación. En un estudio previo realizado en la Universidad de Nicaragua, se comprobó que cepas de *Azotobacter chroccocum* pueden conservarse en melaza por un período de cuatro meses (Pérez, 1997).

RECOMENDACIONES

- Es necesario realizar estudios sobre la capacidad fijadora de nitrógeno y la capacidad productora de hormonas vegetales de las bacterias para poder seleccionar las de mejor rendimiento. También se recomienda seguir aislando cepas en otros terrenos con el fin de obtener un cultivo mixto apto para todo terreno.
- Posterior a esta etapa, es necesario que se realicen pruebas experimentales en el campo para analizar la eficiencia de las bacterias como fijadoras de nitrógeno y productoras de fitohormonas estimulantes del crecimiento de las plantas.
- Se recomienda realizar un análisis químico más detallado de la melaza utilizada para la producción, así como también analizar muestras de melaza provenientes de otros proveedores con el fin de escoger la más adecuada para la producción de *Azotobacter* spp.
- Se recomienda continuar con la evaluación del tiempo de vida útil del producto.
- Se recomienda con el tiempo, adquirir equipo especializado como un biorreactor que permita el control de la temperatura, regulación de pH y oxígeno para poder optimizar los parámetros tecnológicos aquí presentados.

BIBLIOGRAFÍA

1. **Baldiani, J.** 1997. “Recent advances in BFN with non-legume plants”. Soil Biology Biotechnology. 29 (5). 911-922.
2. **Becking, J.** 1961. “Studies on Nitrogen-fixing Bacteria of the Genus *Beijerinckia*”. Oxford University Press. Reino Unido.

3. **Comité Estatal de Normalización de Cuba.** 1992. Norma Cubana: “*Biología agrícola. Azotobacter. Especificaciones*”.
4. **De Troch, P.** 1993. “Bacterial surface polisaccharides in relation: a genetic and chemical study of *Azospirillum brasilense*”. *Disertaciones de la Agricultura.* p 238.
5. **Dhanasekar, R; Viruthagiri, T; Sabarathinam, P.L.** 2003. Poly (3-hydroxybutyrate) Synthesis from a Mutant Strain *Azotobacter vinelandii* Utilizing Glucose in a Batch Reactor. Maryland, USA.
6. **Espín, G.** 2000. “*Biología de Azotobacter vinelandii*”. Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México. [En línea]. Disponible en Internet:
http://www.microbiologia.org.mx/microbiosenlinea/CAPITULO_09/Capitulo09.pdf [Fecha de consulta: 8/Abril/2006]
7. **Gaitán, Isabel; García, Evelyg.** 1998. “Prueba a nivel de campo y escalado a planta piloto del proceso de producción de biofertilizante”. Universidad Nacional de Ingeniería. Managua, Nicaragua.
8. **García, R.** 2001. “Biofertilizantes”. [en línea]. Salamanca-España. Disponible en Internet:
http://coli.usal.es/Web/educativo/biotec_microb/temas/29RubenIglesiasGarcia.pdf (fecha de consulta: 9/07/06).
9. **González, J; Lliuch, C.** 1992. “*Biología del Nitrógeno, Interacción Planta-Microorganismo*”. Editorial Rueda. Madrid, España.
10. **González-López, J; Salmerón, V; Martínez-Toledo, M; Ballesteros, F; Ramos-Cormenzana, A.** 1986. “Production of auxins, gibberellins and cytokinins by *Azotobacter vinelandii* ATCC12837 in chemically defined media and dialyzed soil media”. España.

11. **Holt, J; Krieg, N; Sneath, P; Statey, J; Stanley W.** 1994. "Bergey's Manual of determinative bacteriology". 9na Edición.
12. **Horan, N. Jarman, T. Dawes, E.** 1983. "Studies of some enzymes of aliginic acid biosynthesis in *Azotobacter vinelandii* grown in continuous culture". USA.
13. **IAB, Centro de Investigaciones y Aplicaciones Biotecnológicas.** 2001. "Biofertilizantes". Valencia, España. [en línea]. Disponible en Internet: <http://www.iabiotec.com/respuestas.htm> (Fecha de consulta: 12/09/2006)
14. **Ivanova, P.** 1995. "Caracterización de la melaza nicaragüense". Nicaragua.
15. **Itzigsohn, R. Burdman, S. Okon, Y.** "Plant growth promotion in natural pastures by inoculation with *Azotobacter chroococcum* under suboptimal growth conditions". Arid Soil research and Rehabilitation 13. 2000: 151-158.
16. **Lin, L; Sadoff, H.** 1968. "Encystment and polymer production of *Azotobacter vinelandii* in the presence of β -hidroxibutirato". Londres.
17. **Mandigan, M; Martinko, J; Parker, J.** 2003. "Biología de los microorganismos". Editorial Pearson Prentice Hall. 10^a edición. España.
18. **Martinez, M.** 2005. "Búsqueda y producción de microorganismos benéficos para la agricultura". Seminario: Microorganismos, una herramienta eficaz para la agricultura sustentable. Colombia.
19. **Martínez, V.** 1996. "Ciclo biológico del nitrógeno en el suelo". Editorial Científico-técnica. Habana, Cuba.
20. **Mayea, S. Carone, M. Novo, R. Boado, I. Silveira, E. Soria, M. Moralez, Y. Valiño, A.** 1998. "Aplicaciones de la Microbiología Agropecuaria. Biofertilizantes". Tomo II. Ed. Félix Varela. Cuba.

21. **Mishustin, E; Shilnikova, V.** 1969. The Biological fixation of Atmospheric Nitrogen by Free-living Bacteria. Soil Biology Reviews of Research. UNESCO, Belgium.
22. **Pérez, Carmen.** 1997. “Producción de biofertilizante a partir de *Azotobacter chroococcum*”. Universidad Nacional de Ingeniería. Managua, Nicaragua.
23. **Ramos, F.** 1992. “Genética de la regulación de la asimilación de nitrato en *Azotobacter vinelandii*”. Sevilla, España.
24. **Rodelas, B. González, J. Pozo, C. Martínez-Toledo, M. Salmerón, V.** 2001. “Interacción *Rhizobium/Azospirillum* y *Rhizobium/Azotobacter*, efecto sobre el crecimiento, nodulación y fijación simbiótica de N₂ en *Vicia faba*”. [en línea] Universidad de Granada, España. Disponible en Internet: <http://www.edu-micro.usal.es/sefin/Rodelas.html> (Fecha de consulta: 12/04/06)
25. **Rodríguez, V. Blanco, A.** 2001. “Eficiencia de *Azotobacter chroococcum* en la producción de posturas de *Coffea arabica*”. II Taller sobre biofertilización en los trópicos. Habana, Cuba.
26. **Sabra, W; Zeng, A; Sabry, S; Omar, S; Deckwer, W.** 1999. “Effect of Phosphate and Oxygen Concentrations on Alginate Production and Stoichiometry of Metabolism of *Azotobacter vinelandii* under Microaerobic Conditions”. Londres.
27. **Scrugg, Alan.** 2000. “Biotecnología para ingenieros, sistemas biológicos en procesos tecnológicos”. Editorial Limusa. México.
28. **Suquilanda, Manuel.** 1996. “Agricultura Orgánica”. Ediciones UPS. Fundación para el desarrollo agropecuario FUNDAGRO. Ecuador.
29. **Trevan, M; Boffe, S; Goulding, HK; StaburyP.** 1990. “Biotecnología principios biológicos”. Editorial Acribia, S.A. Zaragoza, España.

30. **Toreto, E. García, M. Martínez, R. Febles, J.** “Avances en el manejo de los suelos y la nutrición orgánica”. [en línea]. Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas (INCA), Instituto Nacional de Investigaciones Fundamentales en Agricultura Tropical (INIFAT), Universidad Agraria de La Habana (UNAH). Disponible en Internet:
http://www.laneta.apc.org/desal/spip/article.php3?id_article=29 (Fecha de consulta 4/05/06)
31. **Velazco, A. Castro, R.** 1999. “Estudio de la inoculación de *Azospirillum brasilense* en el cultivo del arroz (*Oryza sativa*) en condiciones de macetas”. *Cultivos Tropicales* 20 (1). 1999: 5-9.
32. **Vermani, M.V; Kelkar, S.M; Kamat, M.Y.** 1997. “Studies in Polysaccharide Production and Growth of *Azotobacter vinelandii* MTCC2459, a Plant Rhizosphere Isolate”. University of Colorado.

