Universidad Nacional Mayor de San Marcos
Universidad del Perú. Decana de América

Dirección General de Estudios de Posgrado
Facultad de Farmacia y Bioquímica
Unidad de Posgrado

Determinación de parámetros fisico-químicos para la produción de *Azotobacter sp.* nativa del departamento de San Martín – Perú

TESIS

Para optar el Grado Académico de Magíster en Biotecnología

AUTOR

Jesús Luís ZAVALA PUMA

ASESOR

Mg. Mario ALCARRAZ CURI

Lima, Perú

2022



Reconocimiento - No Comercial - Compartir Igual - Sin restricciones adicionales

https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/

Usted puede distribuir, remezclar, retocar, y crear a partir del documento original de modo no comercial, siempre y cuando se dé crédito al autor del documento y se licencien las nuevas creaciones bajo las mismas condiciones. No se permite aplicar términos legales o medidas tecnológicas que restrinjan legalmente a otros a hacer cualquier cosa que permita esta licencia.

Referencia bibliográfica

Zavala J. Determinación de parámetros fisico-químicos para la produción de Azotobacter sp. nativa del departamento de San Martín – Perú [Tesis de maestría]. Lima: Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Unidad de Posgrado; 2022.

Metadatos complementarios

Datos de autor	
Nombres y apellidos	Jesús Luís Zavala Puma
Tipo de documento de identidad	DNI
Número de documento de identidad	25559589
URL de ORCID	Opcional.
Datos de asesor	
Nombres y apellidos	Mario Alcarraz Curi.
Tipo de documento de identidad	DNI
Número de documento de identidad	31159746
URL de ORCID	https://orcid.org/0000-0001-5262-2969
Datos del jurado	
Presidente del jurado	
Nombres y apellidos	Moisés Mesías García Ortiz
Tipo de documento	DNI
Número de documento de identidad	07200816
Miembro del jurado 1	
Nombres y apellidos	Tania Torres Aguilar
Tipo de documento	DNI
Número de documento de identidad	28314802
Miembro del jurado 2	
Nombres y apellidos	Celia Bertha Vargas De la Cruz
Tipo de documento	DNI
Número de documento de identidad	42354741
Miembro del jurado 3	
Nombres y apellidos	Mario Alcarraz Curi
Tipo de documento	DNI

Número de documento de identidad	31159746
Datos de investigación	
Línea de investigación	A.1.2.1 Biorremediación y Bioconversión
Grupo de investigación	Investigación y Desarrollo de Procesos Biotecnológicos, Agroindustriales y Ambientales - IDPBAA
Agencia de financiamiento	Sin financiamiento.
Ubicación geográfica de la investigación	Universidad Nacional Mayor de San Marcos Edificio: Facultad de Ciencias Biológicas. País: Perú Departamento: Lima Provincia: Lima Distrito: Lima Cercado 15081 Latitud: -12.05953255256141 Longitud: -77.08156970052801
Año o rango de años en que se realizó la investigación	Febrero 2018 - Noviembre 2020
URL de disciplinas OCDE	Biología celular, Microbiología https://purl.org/pe-repo/ocde/ford#1.06.01 Otras temas de Biología https://purl.org/pe-repo/ocde/ford#1.06.16

ACTA DE SUSTENTACIÓN VIRTUAL DE TESIS PARA OPTAR AL GRADO ACADÉMICO DE MAGÍSTER EN BIOTECNOLOGÍA

Siendo las **09:00 hrs. del 12 de noviembre de 2022** se reunieron mediante la plataforma de Google meet de la Unidad de Posgrado de la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos, el Jurado Evaluador de tesis, presidido por el Dr. Mesías Moisés García Ortiz e integrado por los siguientes miembros: Mg. Mario Alcarraz Curi (Asesor), Mg. Tania Torres Aguilar y Mg. Celia Bertha Vargas De La Cruz; para la sustentación oral y pública de la tesis intitulada: **"DETERMINACIÓN DE PARÁMETROS FISICO-QUÍMICOS PARA LA PRODUCIÓN DE AZOTOBACTER sp. NATIVA DEL DEPARTAMENTO DE SAN MARTÍN – PERÚ";** presentado por el Bachiller Químico Farmacéutico **Jesús Luís Zavala Puma.**

Acto seguido se procedió a la exposición de la Tesis, con el fin de optar al Grado Académico de **Magíster en Biotecnología**. Formuladas las preguntas, éstas fueron absueltas por el graduando.

A continuación, el Jurado Evaluador de Tesis procedió a la calificación, la que dio como resultado el siguiente calificativo:

DIECISIETE (17) MUY BUENO

Luego, el Presidente del Jurado recomienda que la Facultad proponga que se le otorgue al Bachiller Químico Farmacéutico **Jesús Luís Zavala Puma**, el Grado Académico de Magister en **Biotecnología.**

Siendo las 10:15. hrs. se levanta la sesión.

Se extiende el acta en Lima, a las 10:30 hrs. del 12 de noviembre de 2022.

Dr. Mesías Moisés García Ortiz (P.P., T.C.)
Presidenta

Mg. Mario Alcarraz Curi (P. P.,TC)
Miembro - Asesor

Mg. Tania Torres Aguilar (P.Aux., T.P.)
Miembro

Mg. Celia Bertha Vargas De La Cruz (P.Aux., T.C.)
Miembro

Observaciones:

Universidad Nacional Mayor de San Marcos
Universidad del Perú. Decana de América
Facultad de Farmacia y Bioquímica
Unidad de Posgrado

EL DIRECTOR DE LA UNIDAD DE POSGRADO DE LA FACULTAD DE FARMACIA Y BIOQUÍMICA DE LA UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS QUE SUSCRIBE DEJA,

CONSTANCIA

00035-FFB-UPG-2021

Que mediante procedimiento de la evaluación de originalidad según Resolución Rectoral N° 043005-R-18, de la tesis intitulada "**IDENTIFICACIÓN Y DETERMINACIÓN DE PARÁMETROS BIOQUÍMICOS PARA LA PRODUCCIÓN A ESCALA DE ORGANISMOS PROMOTORES DE CRECIMIENTO VEGETAL DEL GÉNERO AZOTOBACTER NATIVAS DE LA REGIÓN DE RIOJA, DEPARTAMENTO DE SAN MARTÍN - PERÚ"**, presentado por **Jesús Luís Zavala Puma,** con fecha de recepción 09/08/2021, con fecha de aplicación al programa de similitud el 18/08/2021 con el software utilizado el TURNITIN, con las configuración de exclusión de textos entrecomillas, bibliografías y cadenas menores a 40 palabras, mediante el procedimiento de la evaluación de originalidad, el porcentaje de similitud según programa detector es **10%**, por lo que, cumple los criterios de originalidad sin observación, según informe adjunto.

Se expide la presente constancia para el trámite de expedito, según lo establecido en el Reglamento General de Estudios de Posgrado 2018, aprobado con RR. 04790-R-18.

Lima, 19 de agosto de 2021

UNMSM
Firmado digitalmente por JAVE NAKAYO Jorge Leonardo FAU 20148092282 soft
Motivo: Soy el autor del documento
Fecha: 19.08.2021 20:22:31 -05:00

DR. JORGE LEONARDO JAVE NAKAYO
DIRECTOR

JLJN/ecj

ÍNDICE Pag

i. RESUMEN
ii. ABSTRACT
iii. ÍNDICE DE TABLAS Y FIGURAS

I. INTRODUCCIÓN……...1
II. MARCO TEÓRICO…….....…..2
2.1 Antecedentes……..…....2
2.2 Aspectos teórico…….……..…....8
2.2.1 Biofetilizantes…….……..…….....….....8
2.2.2 La rizosfera…..……..……..…9
2.2.3 Bacterias promotoras de crecimiento de las plantas (PGPR)…….....10
2.2.4 Fijación biológica de nitrógeno atmosférico…….....……11
2.2.5 Mecanismos de promoción de crecimiento…….…...13
2.2.6 Solubilización de fósforo inorgánico…….……..…....….....…14
2.2.7 Disponibilidad de hierro……...…….15
2.2.8 Producción de fitohormonas…….……...……...…..15
2.2.9 Producción de antibióticos……..……...17
2.2.10 Fotosíntesis……..……...…17
2.2.11 Bioremediación…….…….17
2.2.12 Género Azotobacter…….……...…….……...17
2.2.13 Cultivo de Azotobacter spp……..…….……..….19
2.2.14 Escalamiento…….…….21

III. METODOLOGÍA…….....22
3.1 Tipo y diseño de investigación..…….....…22
3.2 Unidad de análisis ……..…….22
3.3 Población de estudio…….….22
3.4 Tamaño de muestra…….…...22
3.5 Diseño Metodológico…….……23
3.5.1 Muestreo……..…….……..23
3.5.2 Aislamiento de microorganismos……..…….……23
3.5.2.1 Pre enriquecimiento……...……....…..23

3.5.2.2 Aislamiento de las cepas de Azotobacter……..….23
3.5.2.3 Descripción y caracterización bioquímica…….....….24
3.5.2.4 Sistema de conservación de cepas…….……...…24
3.5.3 Evaluación de las capacidades diazotróficas de las cepas aisladas…..24
3.5.3.1 Determinación de fijación biológica de nitrógeno……....…24
3.5.3.2 Determinación de producción de ácido indolacético.……...……....25
3.5.3.3 Determinación de solubilización de fosfatos…….....…….....26
3.5.4 Optimización de las variables en el proceso de producción de biomasa…..……...27
3.5.4.1 Reactivación de la cepa e inoculación……...…...…..28
3.5.4.2 Programación del bioreactor…….……..…….…29
3.5.4.3 Evaluación de la biomasa…….……..……..29
3.5.4.4 Selección de la cepa con mejor performance……...…..……...…30
3.5.4.5 Elaboración de la curva patrón……..……..30
3.6 Técnicas e instrumentos de recolección de la información de datos……..…….32
3.7 Procesamiento de la información o de datos…….32

IV. RESULTADOS…….……..33
4.1 Aislamiento y caracterización Azotobacter sp…….……...……33
4.2 Evaluación de la capacidades diazotróficas de las cepas aisladas.……....……....38
4.2.1 Determinación de fijación biológica de nitrógeno..……..38
4.2.2 Determinación de producción de ácido indolacético..…….……...……..40
4.2.3 Determinación de solubilización de fosfatos…….……..…42
4.3 Optimización de las variables en el proceso de producción de biomasa……..…...47

V. DISCUSIÓN……...……..…50
VI. CONCLUSIONES……..…..…53
VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS…….……..…..54
VIII. ANEXOS…….……..……...….61

i. RESUMEN

El presente estudio se realizó con el objetivo de identificar y determinar los parámetros fisicoquímicos para su producción a escala de la cepa *Azotobacter sp.,* nativa de una zona cafetalera en la provincia de Rioja, departamento de San Martín, que presenta un gran potencial para ser utilizado como promotor de crecimiento vegetal.

Para su análisis se recolectaron varias muestras del suelo, cercanas a las raíces de los cafetales, las cuales fueron trasladas al laboratorio para su evaluación.

Se realizaron las pruebas de identificación cualitativa mediante evaluación macroscópica y pruebas bioquímicas. La evaluación de su capacidad para solubilizar fosfatos, producir ácido indolacético y fijar nitrógeno.

Finalmente, se determinaron los mejores parámetros fisicoquímicos para su obtención a escala de laboratorio.

De todas las muestras evaluadas se encontraron 2 cepas con el mejor perfil biofertilizante, seleccionándose una de ellas (1F), para luego determinar las mejores condiciones del cultivo en un Biorreactor Sartorius modelo Biostat A, lográndose establecer las condiciones más óptimas para su cultivo en términos de velocidad de agitación, pH, temperatura y consumo de oxígeno.

De los resultados obtenidos se concluye que las cepas a condiciones de pH 7, 30°C, 120 RPM y 1VVM, se obtiene el mayor rendimiento de biomasa para la cepa seleccionada.

Palabras Claves: Biofertilizantes, *Azotobacter sp*., Rizosfera, Fijación de nitrógeno, Solubilización de fosfatos, Ácido indol acético.

ii. ABSTRACT

The objective of this thesis work was to identify a native strain of *Azotobacter sp* from a coffee growing area of Pichanaki Department of San Martin, with a potential to be used as a biofertilizer and to determine the physical-chemical parameters for its scale production in a bioreactor; for this purpose, samples were carried out close to the roots of the coffee plantations, their conservation and transfer to the laboratory, qualitative identification through macroscopic evaluation and biochemical tests, evaluation of their ability to solubilize phosphates, produce indole acetic acid and fix nitrogen, and finally cultures in a bioreactor to determine the best physicochemical parameters for obtaining them on a laboratory scale. Of all the samples evaluated, 2 strains with the best profile were found, one of them (1F) being selected based on its best profile as a biofertilizer, to then determine the best culture conditions in a Bioreactor Sartorius model Biostat A, being able to establish the conditions more optimal for cultivation in terms of agitation speed, pH, temperature and oxygen consumption, concluding that at 120 RPM, pH 7, at 30 ° C. 1VVM the highest biomass yield of the selected strain is obtained.

Keywords: Biofertlizer, Azotobacter sp, rizhosfera, nitrogen fixation, phosphate solubilization, indolacetic acid.

iii. INDICE DE TABLAS Y FIGURAS

TABLAS

Tabla 1. Principales microorganismos de vida libre.

Tabla 2. Concentraciones medidas para realizar la curva patrón a 632nm.

Tabla 3. Concentraciones usadas para la elaboración de la curva patrón.

Tabla 4. Aleatorización de las variables empleadas en la producción y optimización de biomasa de *Azotobacter sp.*

Tabla 5. Parámetros establecidos en el biorreactor.

Tabla 6. Elaboración de la curva patrón de las UFC en la cinética de crecimiento.

Tabla 7. Características de las macrocolonias aisladas.

Tabla 8. Pruebas bioquímicas de las cepas aisladas.

Tabla 9. Cepas con las concentraciones más altas de nitrógeno fijado.

Tabla 10. Evaluación de la producción de ácido indolacético de las cepas aisladas.

Tabla 11. Medio SMRS.

Tabla 12. Medio PIKOVSKAYA.

Tabla 13. Absorbancias medidas de la cinética de crecimiento. Cepa 1F, con parámetros de 80 RPM, pH 7,0 y 30°C, 1VVM.

Tabla 14. Absorbancias medidas de la cinética de crecimiento. Cepa 1F, con parámetros de 80 RPM, pH 7,0 y 28°C, 1VVM.

Tabla 15. Absorbancias medidas de la cinética de crecimiento. Cepa 1F, con parámetros de 80 RPM, pH 6,0 y 30°C, 1VVM.

Tabla 16. Absorbancias medidas de la cinética de crecimiento. Cepa 1F, con parámetros de 80 RPM, pH 6,0 y 28°C, 1VVM.

Tabla 17. Absorbancias medidas de la cinética de crecimiento. Cepa 1F, con parámetros de 120 RPM, pH 7,0 y 30°C, 1VVM.

Tabla 18. Absorbancias medidas de la cinética de crecimiento. Cepa 1F, con parámetros de 120 RPM, pH 7,0 y 28°C, 1VVM.

Tabla 19. Absorbancias medidas de la cinética de crecimiento. Cepa 1F, con parámetros de 120 RPM, pH 6,0 y 30°C, 1VVM.

Tabla 20. Absorbancias medidas de la cinética de crecimiento. Cepa 1F, con parámetros de 120 RPM, pH 6,0 y 28°C, 1VVM.

Tabla 21. μ Max Determinación

FIGURAS

Fig 1. Procesos mediados por microorganismos.

Fig 2. Enzima nitrogenasa.

Fig 3. Bioquímica de la fijación de nitrógeno.

Fig 4. Mecanismos de acción de los biofertilizantes.

Fig 5. Ciclo de solubilización de fosfatos.

Fig 6. Forma estructural de una molécula de ácido indolacético.

Fig 7. Bioquímica de la producción de ácido indolacético.

Fig 8. Ciclo de cultivo microbiano.

Fig 9. Porcentaje de cepas aisladas que coinciden con la morfología para el género *Azotobacter sp*.
Fig 10. Macrocolonias de las cepas 1F (A) y 1G (B).
Fig 11. Pruebas bioquímicas con fuente carbonada manitol.
Fig 12. Pruebas bioquímicas con fuente carbonada glucosa.
Fig 13. Pruebas bioquímicas con fuente carbonada lactosa.
Fig 14. Prueba de fijación de nitrógeno.
Fig 15. Producción de ácido indolacético.
Fig 16. Prueba colorimétrica utilizando reactivo de Salkowski en caldo triptófano.
Fig 17. Presencia de halos concéntricos amarillos alrededor de la colonia (SMRS).
Fig 18. Solubilización de fosfatos en medio Pikovskaya.
Fig 19. Prueba de cuantificación de ortofosfatos, mediciones en mg L-1.
Fig 20. Prueba de cuantificación de ortofosfatos con el kit HACH.
Fig 21. Cinética de crecimiento de la cepa 1F, con parámetros 80 RPM, pH 7,0 y 28°C.1.0VVM
Fig 22. Línea de tendencia polinómica de grado 2, cinética 1.
Fig 23. Cinética de crecimiento 2 de la cepa 1F, con parámetros 120 RPM, pH 7,0 y 30°C. 1VVM
Fig 24. Línea de tendencia polinómica de grado 2, cinética 2.
Fig 25. Cinética Fase Exponencial. Cepa 1F
Fig 26. Operacionalización de los parámetros para la cinética de crecimiento de la cepa 1F
Fig 27. Biorreactor Sartorius BioStat A
Fig 28. Curva patrón de la cepa 1F. R2=0.9645
Fig 29. Análisis ANOVA – Fijación de nitrógeno
Fig 30. Prueba de Tukey – Fijación de nitrógeno
Fig 31. Análisis ANOVA – Producción ácido indolacético
Fig 32. Prueba de Tukey – Producción ácido indolacético
Fig 33. Análisis Factorial – CC 120RPM, pH 7, 30ºC, 1VVM
Fig 34. Análisis de Superficie de Respuesta – CC 120RPM, pH 7, 30ºC, 1VVM.

I.- INTRODUCCIÓN

El aumento de la población mundial hace necesario el desarrollo de nuevas tecnologías para suplir las necesidades básicas del ser humano, entre ellas la alimentación. Actualmente, en el campo de la agricultura se vienen utilizando distintas estrategias, a fin de optimizar los cultivos de una serie de plantas, para lo cual se están incorporando distintas tecnologías para optimizar los recursos hídricos, selección de cultivos más adecuados para determinados tipos de suelos, uso de fertilizantes eco-amigables, entre otros.

En cuanto a fertilizantes, los biofertilizantes se presentan como una buena opción. Los biofertilizantes son microorganismos que permiten a las plantas adquirir los nutrientes necesarios para su desarrollo y al mismo tiempo preservar la calidad de los suelos, ayudando a mantener un ecosistema saludable.

Existen diferentes tipos de microorganismos que actúan como biofertilizantes y que poseen la capacidad de fijar el nitrógeno atmosférico, solubilizar sales de fosfatos insolubles, bioremediar suelos, producir fitohormonas, etc. Sin embargo, a pesar de presentar estas características, existen limitantes que deben ser evaluadas antes de ser utilizados como tales.

Por ello, se hace necesario llevar a cabo estudios en el laboratorio a fin de definir su potencial como biofertilizante y determinar las variables fisicoquímicas que afectan su crecimiento para la obtención de biomasa.

Para el efecto se proponen los siguientes objetivos para el desarrollo del presente trabajo de tesis:

- Obtener microorganismos diazotroficos a través del muestro de tierra próxima a al área rizosférica de las raíces.
- Aislar una cepa nativa de *Azotobacter sp* e identificación mediante pruebas bioquímicas y evaluación macroscópica de una cepa del género *Azotobacter sp*.
- Determinar su capacidad diazotrofica.
    - Fijación de nitrógeno.
    - Solubilización de fosfatos.
    - Producción de fitohormonas.

- Determinar los parámetros fisicoquímicos que hagan posible su producción en un biorreactor.

II. MARCO TEORICO

2.1 Antecedentes

Según Tejera N et al. (2005) [1] , el uso indiscriminado de fertilizantes químicos, están produciendo un desbalance en los ecosistemas, reduciendo la fertilidad de los suelos y alterando la microflora inherente a cada terreno. Cada flora biótica metaboliza elementos nutricionales del suelo y proveen a las plantas elementos nutricionales para su sustento de otros organismos.

Aguado G et al. (2012) [2] señalan que el fertilizante químico más conocido es el amoniaco, el cual debe aplicarse en proporciones adecuadas para no ser perjudicial al medio ambiente.

Tradicionalmente, desde hace mucho tiempo se vinieron utilizando los fertilizantes orgánicos como los excrementos de animales y los residuos vegetales (compost), los cuales proveen a los cultivos, con nutrientes por un largo periodo de forma lenta y prolongada como lo señalan Niladri P et al. (2019) [3]. La tendencia actual por el consumo de productos saludables, especialmente aquellos denominados como "orgánicos" suelen demandar una gran cantidad de fertilizantes orgánicos con un impacto negativo en la salud pública y el medio ambiente, según lo indican Hamzaoui-Essoussi L et al. (2012) [4]

En este escenario, los biofertilizantes surgen como una buena alternativa, ya que ayudan a facilitar el desarrollo de las plantas a través de varios procesos metabólicos, entre ellos la fijación de nitrógeno atmosférico tal como lo señalan Sethi S et al. (5), no deterioran el medio ambiente y ayudan a bioremediar los suelos de la contaminación ambiental como lo señalan Dibut B et al. (2009) [6] .

Distintos autores como Asif M et al. (2018) [7] y Mushtaq Z et al. (2021) [8] señalan que distintos géneros de bacterias que actúan como biofertilizantes, entre ellos *Azotobacter, Rhizobium, Azospirillum, Aspergillus*, *Azolla, Acetobacter, Nostoc*, etc. que son los géneros más prometedores para ser utilizados como biofertilizantes.

De otro lado Ridvan Kizilkaya. (2009) [9] , indica ciertas consideraciones que deben tomarse en cuenta cuando se plantee el uso de un biofertilizante como temperatura, profundidad del suelo, humedad, etc., a fin de obtener los mejores resultados posibles y mejorar así los rendimientos en las cosechas; así también Carvajal-Muñoz J et al. (2012) [10] señalan algunas limitaciones como por ejemplo las grandes cantidades de biofertilizantes que se necesitan en comparación a los fertilizantes químicos.

En 1902, Gerlach and Voel fueron los primeros en plantear el uso de *Azotobacter sp.* como biofertilizante para nutrir los suelos con el nitrógeno fijado por este microorganismo, siendo el género *Azotobacter sp*. uno de los tantos microorganismos que pueden ser utilizados para la producción de biofertilizantes como lo señala Malusa E et al. (2016) [11], pero a pesar de los muchos estudios que se han hecho y hallazgos de cepas benéficas, su aplicación como fertilizantes en la agricultura, aún está limitada por varios factores, principalmente porque los resultados en el campo no son necesariamente los que se obtienen en el laboratorio, debido probablemente a problemas mutación de la cepa, adaptabilidad, interrelaciones de los microorganismos con el medio ambiente y como lo indican Bashan Y et al. (2015) [12] la tecnología que se aplica para su obtención.

Azotobacter sp. es una bacteria Gram negativa, no simbiótica, de vida libre y que puede vivir en ambientes libres de nitrógeno dada su capacidad diazotrófica aeróbica, ayuda a mejorar la solubilidad de las sales de fosfato, produce agentes reguladores de crecimiento de plantas como las auxinas, giberelinas, citoquininas, vitaminas y aminoácidos. Su actividad catabólica es tal, que puede utilizar también compuestos aromáticos como el benceno, benzoatos, lindenos, p-tolueno, etc., como lo señala Revilla J et al. (2005) [13].

Azotobacter sp. tiene la capacidad de fijar nitrógeno de la atmosfera gracias al sistema de nitrogenasas que posee e incluso bajo alta tensión de oxígeno, según indican Mus F et al. (2016) [14].

La síntesis de estas nitrogenasas es regulada por la concentración de amonio en el medio, por ende, si su concentración aumenta se reprime la síntesis de nitrogenasas disminuyendo así la fijación de nitrógeno y a través del glicólisis y del ciclo de Krebs. Wagner Stephen (2011) [15] indica que *Azotobacter sp.* obtiene

su propia energía para fijar el nitrógeno de la atmósfera oxidando moléculas orgánicas liberadas por otros microorganismos.

Se ha observado que la inoculación en el suelo de cepas de *Azotobacter sp.* provoca un aumento en el rendimiento de los cultivos de diversas plantas a través de la medición del aumento de la biomasa como lo evidenciaron Mahdi S et al. (2010) [16], y en investigaciones comparativas llevadas a cabo por Gamaruddin et al. (2019) [17] para determinar el impacto en la producción de cacao utilizando *Azotobacter chroococcum* y un fertilizante orgánico líquido, para el efecto se utilizaron diseños aleatorios de bloques con dos factoriales (*A. chroococcum* y el fertilizante orgánico líquido) en diferentes concentraciones, llegándose a la conclusión que la efectividad de la absorción de nitrógeno y fósforo fue mayor con la concentración 40 x 10^6 UFC de *Azotobacter chroococcum*, logrando un 30% más de productividad respecto del fertilizante orgánico líquido.

De manera similar, Alizadeh O et al. (2011) [18] aplicaron *Azotobacter sp.* en combinación con otras bacterias, como el *Azospirillum*, logrando optimizar la captación de nitrógeno de 60 a 120 kg/ha. En ese mismo sentido, Habibi A et al. (2011) [19] evidenciaron que el uso de una mezcla de biofertilizantes con fertilizantes químicos y orgánicos se logra una mayor productividad, reduciendo en casi 50% el uso de fertilizantes convencionales, reduciendo costos de producción y minimizando la contaminación del medio ambiente.

Din M et al. (2019) [20] estudiaron la capacidad de fijación de nitrógeno por parte de *Azotobacter sp*. y la capacidad solubilizadora de fosfatos de Aspergillus *niger,* concluyendo que la inoculación de semillas con ambos microorganismos se obtienen mejores resultados.

Escobar C et al. (2011) [21] caracterizaron y determinaron el efecto que producen las cepas nativas de *Azotobacter sp*. en el crecimiento y desarrollo de la planta de "tomate" *Lycopersicon esculentum Mill*., llegando a la conclusión, que las cepas nativas de *Azotobacter sp.* influencian positivamente en el crecimiento y desarrollo de la planta de tomate y su efectividad fue superior cuando se le inocularon en combinación con otros microorganismos.

Así mismo, *Azotobacter sp.* tiene características peculiares que ayudan a bioremediar los suelos por metales pesados, aceites, pesticidas, etc. como lo señalan Sumbul A et al.(2020) [22], cuando evaluaron su capacidad de quelar

algunos cationes a través de proteínas denominadas sideróforos; así también Fitriatin B et al.(2019)[23] señalan que *Azotobacter sp* en combinación con microorganismos solubilizadores de fosfato mejoran las cosechas y la eficiencia de los fertilizantes.

Alfani Y et al (2019)[24] también demuestran el aumento de la productividad de las cosechas de soya cuando se agregan aditivos como agua de coco, maleza y salvado a inoculos de *Azotobacter sp*, logrando un aumento en la altura de las plantas y contenido de clorofila.

Los estudios expuestos demuestran que el uso de *Azotobacter sp.* como biofertilizante resulta una muy buena alternativa para mitigar la falta de nitrógeno en los suelos, como también lo señala Sethi S et al. (2012)[25], en estudios para mejorar el rendimiento de las cosechas.

Es importante señalar que muchos biofertilizantes han demostrado su rentabilidad económica respecto a los fertilizantes químicos, como se puede apreciar en la siguiente tabla:

Cantidad de biofertilizante	**Cantidad equivalente de fertilizante químico**	**Ahorros en nutrientes químicos**
1TM *Rhizobium*	100 – 400 TM Urea	50 – 200 TM de N2 (Fijación mínima de 50 kg/ha)
1TM *Azotobacter -Azospirilum*	50 -100 TM Urea	20TM de N2 (Fijación mínima de 20 kg/ha)
1TM *Acetobacter*	80 – 120 TM Urea	40 – 60 TM de N2 (Fijación mínima de 200 -300 kg/ha)

Fuente: Mahato A et al.[26]

Sin embargo, esto aún no es suficiente para lograr su uso masivo, principalmente por los siguientes factores:

- No disponer de cepas adecuadas - Los biofertilizantes no necesariamente funcionan igual en cualquier ecosistema, existiendo varios factores medioambientales que afectan su desempeño. Por ello, es ideal trabajar con

cepas nativas del área donde se deseen aplicar y así minimizar los efectos del medio ambiente y terreno [27].

- Carencia del carrier o soporte más adecuado – Del cual depende la vida media útil del microorganismo, lugar donde el microorganismo podrá replicarse constantemente manteniendo las concentraciones adecuadas de aplicación. Los desechos vegetales funcionan bien como carriers, seguidos por la lignita, carbón, excrementos de animales, suelos y cáscaras de arroz, considerando que se deben evaluar estos carriers por cada cepa en particular [28].
- Mutación – Los biofertilizantes como cualquier bacteria tienden a mutar, ya sea durante el proceso de fermentación o almacenaje. Lo cual provoca que su desempeño como biofertilizante se vea afectado adversamente [16].

- Formulación – Cada microorganismo tiene un comportamiento metabólico distinto que hace necesario encontrar la combinación correcta con otros microorganismos, fertilizantes o aditivos que aseguren su viabilidad y efecto en los terrenos a aplicar [29].

- Afectación de los eco-sistemas – La aplicación de microorganismos en terrenos que no le son propios pueden acarrear problemas de interacción con otros microorganismos nativos de ese eco-sistema, generando un efecto antagonista y compitiendo por su supervivencia [30].

- Otro de los retos a salvar, es la correcta aplicación de los biofertilizantes. A este respecto Hassan T et al. (2016) [31] han evaluado distintas estrategias con el fin de mantener la viabilidad de las cepas, su concentración y su vida media. Una de ellas tiene que ver con la formulación, es decir, si el biofertilizante va acompañado de otro biofertilizante, aditivo químico o fertilizante químico u orgánico; en ese sentido algunos estudios señalan que una buena formulación mejora la vida útil de los biofertilizantes, así como la mejora en los rendimientos de las cosechas.

- Gomare K et al. (2013) [32] señalan que una forma básica de formulación es la mezcla del biofertilizante con la tierra, mezclándolos mediante un carrier o

soporte donde posteriormente se colocan las semillas. También es posible aplicarlos mediante formulaciones líquidas porque son más fáciles de dispersar en el campo, su vida media es mayor y se favorece la tolerancia al aumento de la temperatura, y la estabilidad de su vida media, tal como lo indican Satinder B et al. (2012) [33].

Finalmente, la última etapa en el uso de los biofertilizantes es su masificación y producción a escala industrial. Para el efecto, se han desarrollado diversos estudios a nivel de laboratorio para determinar las mejores condiciones para su cultivo, las cuales deben ser replicadas a escala industrial, manteniendo la calidad de producto final. Por ello, el proceso de escalamiento no solamente se trata de reproducir el proceso de cultivo en el laboratorio, sino también de aquellas otras variables, como la velocidad de agitación, la geometría de los tanques y la transferencia de oxígeno, etc. a fin de garantizar una producción óptima del producto final [34].

Diversos estudios dan cuenta de la producción eficiente de estos biofertilizantes para facilitar su aplicación. Por lo general, se evalúa la cepa con mayor potencial de biofertilizante para determinar las mejores condiciones de cultivo.
Gutierrez-Rojas I et al. (2011) [35] señalan que variables como el tipo de fuente de carbono influye también en la velocidad de crecimiento de la cepa *Azotobacter sp.* así también el aumento de la concentración de fosfatos en el medio no afecta el aumento de la biomasa, pero si presenta un gran impacto en el aumento de producción de exopolisacáridos (EPS) como lo señalan Azam Z et al. (2019) [36] que redunda en que la planta soporte mejor el stress ambiental. Gauri S et al. (2012) [37] también indican que la absorción de metales, la tolerancia a las sales, etc. se ven favorecidas.

La transferencia de oxígeno también es otra variable a tomar en cuenta, ya que en el proceso de cultivo se presentan cambios reológicos que dificultan dicha transferencia, por lo que es necesario implementar estrategias de cultivo para superar este problema, como lo indican Díaz-Barrera A et al. (2010) [38].

Una de las especies más estudiadas del género *Azotobacter sp.* es el *Azotobacter chrooccocum*, con el cual se han evaluado diferentes metodologías de cultivo y

donde se han determinado las mejores estrategias de cultivo para optimizar la producción de biomasa. Damir O et al. (2011) [39] evidenciaron que reutilizando la misma cepa para subsecuentes procesos de fermentación (lote repetido), el proceso mejora al obtener una buena cantidad de biomasa, comparado a otras metodologías.

Por último, para abaratar estos procesos de escalamiento, se sugiere el uso de cepas nativas y materiales de la zona porque al estar mejor adaptadas permiten obtener procesos de producción a escala más económicos, facilitar su masificación y que sea un proceso más factible de ejecutar [40].

2.2 Aspectos teóricos

2.2.1 Biofertilizantes

Según Mahato A et al (2021) [26] , un biofertilizante es un inoculo de microorganismos, por lo general procarioticos, que aumentan la disponibilidad de nutrientes a la planta, principalmente nitrógeno. Así mismo, solubilizan sales insolubles de fosfato, sintetizan fitohormonas, descomponen la materia orgánica y bioremedian los suelos. Cuando son aplicadas a las semillas o suelos, aumentan la disponibilidad de los nutrientes hacia las plantas, mejorando la productividad de las cosechas.

De acuerdo a Mohammadi K et al. (2012) [28] los biofertilizantes son eco-amigables con el medio ambiente, no producen sub- productos tóxicos y mantienen una relación de ayuda mutua con las plantas, que se lleva a cabo en las rizosferas de las raíces.

Las ventajas de los biofertilizantes derivan de los efectos favorables que producen en la agricultura, como, por ejemplo:

- Aumentan la productividad agrícola.
- Pueden ser utilizados en conjunto con los fertilizantes convencionales.
- No contaminan el medio ambiente y aumentan la fertilidad de los suelos.
- Solubilizan nutrientes para las plantas, como las sales de fosfato insolubles.
- Según Barman et al. (2017) [41] son eco-amigables con el medio ambiente no perjudicándolo.

Existen varias clasificaciones para catalogar a los biofertilizantes, pero en relación con su interdependencia con las plantas se clasifican como:

- Biofertilizantes simbióticos fijadores de nitrógeno en asociación con la planta, como las bacterias del género *Rhizobium spp*.
- Mantilla - Lara C et al. (2007) [42] indican que los biofertilizantes asimbióticos de vida libre, como las del género *Azotobacter sp.*

2.2.2 La rizosfera

Según Xiong Q et al. (2021) [43], la rizosfera es un ecosistema que se ubica en las raíces de las plantas donde conviven microorganismos alrededor de ella, en una relación simbiótica que de una u otra manera se favorecen mutuamente. Aquí se forman comunidades únicas que degradan, mineralizan o polimerizan los compuestos tóxicos cercanos a ella.

Las propiedades fisicoquímicas de esta zona son diferentes a las que se encuentran en suelos no rizosfericos. En condiciones normales las poblaciones microbianas en estas áreas son de alrededor de 10^{12} UFC/g que descienden hasta 10^{4} UFC/g cuando está sometido a condiciones de stress. Urgiles - Gomez N et al. (2021) [44]. Señalan que la cantidad de bacterias que se pueden aislar de esta zona depende de muchos factores, entre ellos: la temporada, el tipo de suelo, la vegetación a su alrededor, el contenido de humedad, contaminación, etc. según indican Kilian M et al. (2001) [45].

Huang X et al. (2014) [46] estiman que las raíces de las plantas pueden llegar a liberar entre 5 a 21% del carbono asimilado en forma de azúcares solubles, aminoácidos o metabolitos secundarios, lo que favorece el incremento de las densidades poblacionales de los microorganismos alrededor de esta zona.

Así, la rizosfera actúa como una zona de amortiguación microbiológica, en donde el microbiota sirve de protección a la planta frente al ataque de patógenos o compuestos tóxicos derivados de pesticidas o fertilizantes químicos utilizados durante el cultivo de las plantas, como lo señalan Mendes R et al. (2013) [47]; así mismo el uso a largo plazo de fertilizantes químicos alteran la biodiversidad de microorganismos de la rizosfera debido al aumento de contenido de amonio y disminución del pH de los suelos según concluyen estudios de Bai Yong-Chao et al. (2020) [48].

2.2.3 Bacterias promotoras del crecimiento de las plantas (PGPR)

Son microorganismos procarióticos que de forma natural colonizan las raíces o el suelo de la rizosfera. Son beneficiosos para los cultivos y se les conoce como rizobacterias promotoras del crecimiento de las plantas (PGPR). Kumar R et al. (2017)[49] los denominan bioestimulantes por producir fitohormonas, que incluyen al ácido indolacético, citoquininas, giberelinas e inhibidores de la producción de etileno, etc., que favorecen el desarrollo de las plantas.

Tabla 1. Principales microorganismos de vida libre y endófitos estudiados que tienen potencial para biofertilizantes.

PGPR	Relación con el hospedero	Cultivos hospederos
Azospirillum spp.	Rizosférico	gramíneas, tubérculos
Agrobacterium spp.	Endofítico	tubérculos
Azotobacter spp.	Rizosférico	gramíneas, tubérculos
Bacillus spp.	Rizosférico	gramíneas, tubérculos
Burkholderia spp.	Endofítico	gramíneas, tubérculos
Gluconacetobacter	Endofítico	gramíneas, tubérculos
Herbaspirillum	Endofítico	gramíneas, tubérculos

Fuente: Jha C et al. [50]

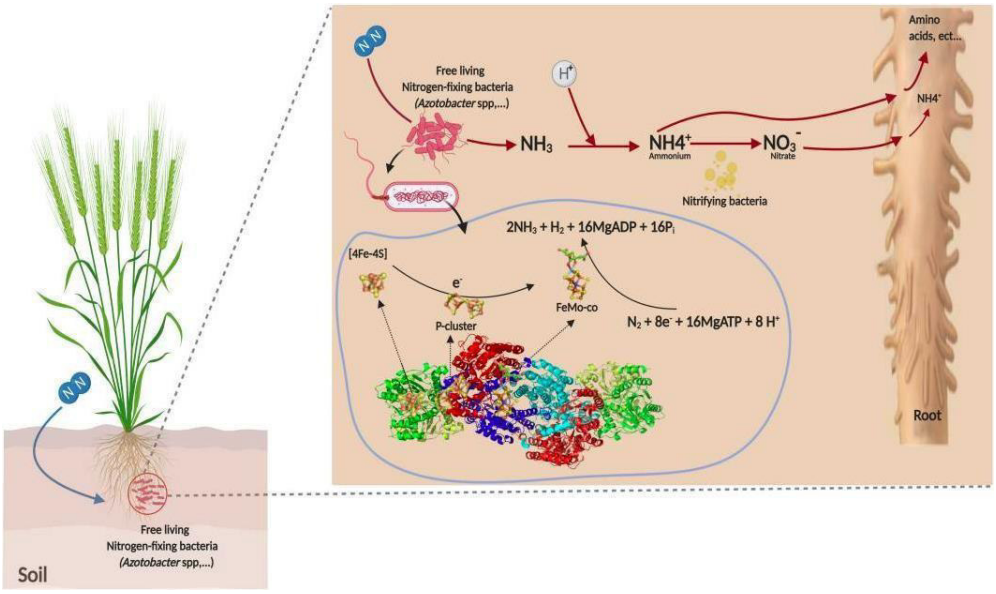
2.2.4 Fijación biológica de nitrógeno atmosférico

Según Mahaty T et al. (2016) [51], la característica más resaltante de los biofertilizantes es la capacidad de fijar el nitrógeno atmosférico. El nitrógeno es el elemento principal que utilizan las plantas como nutrientes y se obtienen desde la atmósfera o a través de fertilizantes químicos u orgánicos.

En el primer caso, Gothwal R et al. (2008) [52] indican que los biofertilizantes promueven la biodisponibilidad del nitrógeno convirtiendo el nitrógeno inorgánico en orgánico, a través de un complejo sistema de nitrogenasas que se modulan, de acuerdo con la ausencia o presencia de amonio en el medio, facilitando su disponibilidad para las plantas, lo que redunda en una mayor productividad y rendimiento. Adicionalmente, Fasusi O et al. (2021) [53] señalan que los biofertilizantes producen compuestos orgánicos volátiles que incluyen acetona, 3-butanediol, terpenos, isoprenos, etc. que están clasificados como compuestos naturales y que también promueven la resistencia de las plantas frente a agentes fitopatógenos.

Bajo este mecanismo, los biofertilizantes pueden transformar el nitrógeno atmosférico en una forma orgánica de fácil asimilación para las plantas en un orden de 300 – 400 Kg N/ha/año [54].

Figura 1. Procesos mediados por microorganismos



Fuente: Aasfar A et al. [30].

Verma D et al. (2019) [55] señalan que para la fijación de nitrógeno atmosférico es esencial la presencia de las enzimas nitrogenasas. Estas no son sino enzimas oxidorreductasas que ayudan a catalizar reacciones de óxido-reducción y reducen el nitrógeno molecular a nitrógeno orgánico mediante una serie de complejas reacciones bioquímicas con la ayuda de las enzimas nitrogenasas.

Según Einsle O et al. (2020) (56) la nitrogenasa esta conformada por dos metaloproteínas componentes, la proteína de hierro (Fe) y la proteína de molibdeno-hierro (MoFe). La proteína MoFe está organizada como un tetrámero α2β2 NifD2K2, de peso molecular aproximadamente 230 kDa. Funcionalmente, el cofactor FeMo representa el sitio de reducción del sustrato, mientras que el grupo P sirve como aceptor inicial de electrones de la proteína Fe.

El otro componente es la proteína que solo contiene hierro, el cual es sensible a moléculas de oxígeno y solo contiene estructuras tipo 4Fe4S, así como dos sitios de enlace MgATP.

Para activar la enzima nitrogenasa se precisa la participación de una molécula del componente I o proteína Fe-M y dos moléculas del otro componente II o proteína que contiene un átomo de hierro.

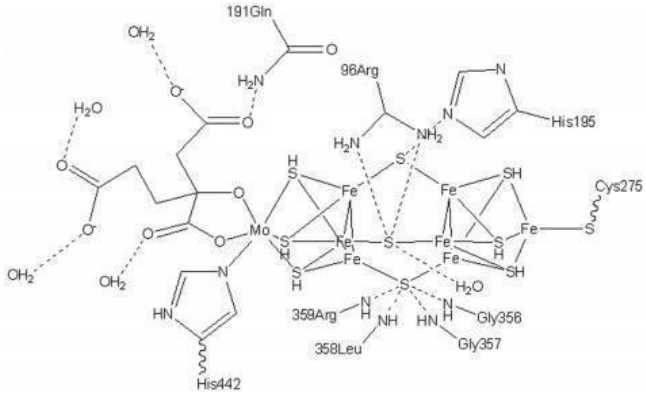


Figura 2.- Enzima nitrogenasa, los elementos Mo y Fe actúan como cofactores. Fuente: Lovell et al. (57)

La fijación biológica ocurre de acuerdo con la siguiente reacción:

$$N_2 + 8H^+ + 8e^- + 16ATP \Leftrightarrow 2NH_3 + H_2 + 16ADP + 16Pi$$

Donde se producen 2 moles de amoníaco por un mol de nitrógeno a expensas del consumo de 16ATPs y el suministro de electrones y protones (iones de hidrógeno).

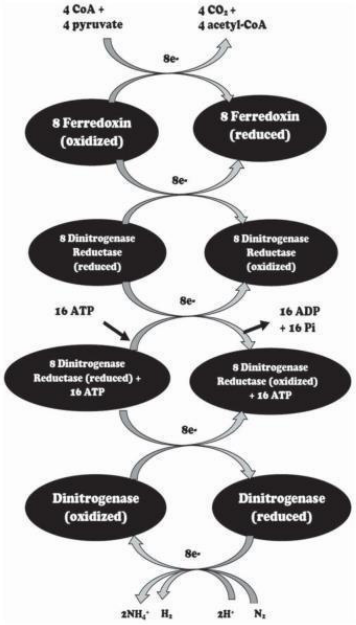


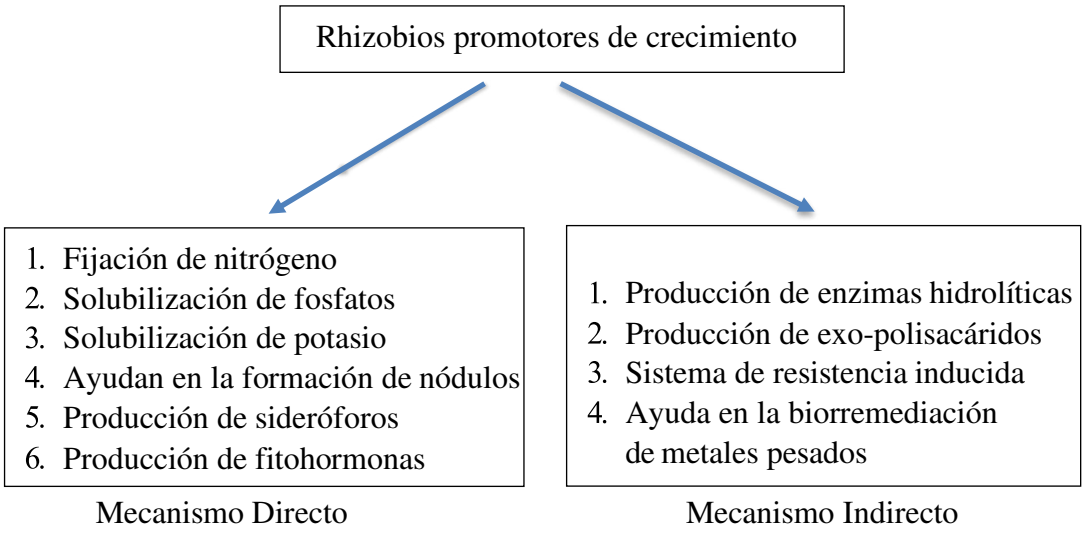
Figura 3. Bioquímica de la fijación de nitrógeno.
Fuente: Verma D et al. [55]

Este consumo de energía en forma de ATPs reduce la disponibilidad energía que la planta necesita para su desarrollo.

2.2.5 Mecanismos de promoción de crecimiento

Los microorganismos que promueven el crecimiento de las plantas son aquellas de vida libre y que mantienen una relación estrecha con las plantas, donde ambas se benefician mutuamente (simbiosis) y en general, promueven el desarrollo de la planta por mecanismos directos, como facilitar la fijación de nitrógeno o aumentando los niveles de fitohormonas, la solubilización de fosfatos, etc. e indirectamente reduciendo el efecto patogénico de otros microorganismos, ya sea por competencia como lo señalan Tan K et al. (2015)[58] o porque reducen la disponibilidad de oligoelementos como el hierro (Fe^{+3}), porque producen agentes quelantes denominados sideróforos, que capturan el hierro limitando su disponibilidad para agentes patógenos, según señalan Kumar S et al. (2012) [25].

Figura 4. Mecanismos de acción de los biofertilizantes



Fuente: Mahaty T et al. [51]

2.2.6 Solubilización de fosfato inorgánico

Otro elemento necesario para el desarrollo de las vegetales es el fósforo que se encuentran en los suelos, bajo la forma de fosfatos insolubles, que no pueden ser aprovechados por las plantas.

Según Glick Bernard (2012) [59], los biofertilizantes secretan ácidos orgánicos como el ácido glucónico, ácido cítrico, cuyos radicales hidroxilos y carboxilo quelan los cationes de las sales y de esa manera transforman los fosfatos insolubles, a sus formas solubles monobásico y dibásico [60] , que pueden así ser aprovechadas por las plantas.

Los mecanismos más aceptados que explican los mecanismos de solubilización de los fosfatos minerales por parte de estos microorganismos son: la producción de ácidos orgánicos, la liberación de protones (normalmente involucrada en la asimilación de NH_4^+ y/o en los procesos respiratorios) y la liberación de ácidos inorgánicos y CO_2 [61].

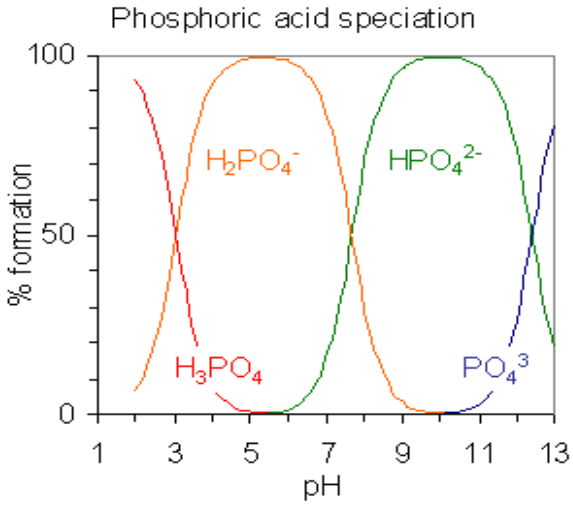


Figura 5.- Ciclo de solubilización de fosfatos.

Fuente: Zeitoun R et al. [62]

2.2.7 Disponibilidad de hierro

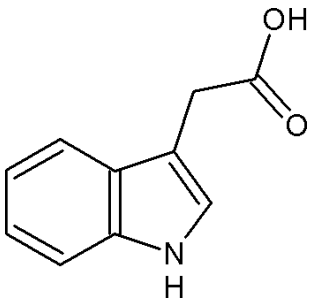
Algunos biofertilizantes tienen la capacidad formar quelatos con el hierro oxidado (Fe+3) a través de agentes quelantes denominados sideróforos. Hider R et al. (2010) (63) señalan que estos reducen el hierro a (Fe+2), volviéndolos solubles y haciéndolos biodisponibles para las plantas, que de otra forma no podrían asimilarlo.

2.2.8 Producción de fitohormonas

Las fitohormonas son esenciales para el desarrollo de las plantas. Uno de ellos es el ácido indolacético, el cual es sintetizado por los microorganismos como subproductos y que favorece el desarrollo de las plantas en su diferenciación celular, estimula la germinación de las semillas, tubérculos, el desarrollo de las raíces y la formación de los nódulos en las raíces [51].

La producción de ácido indolacético es una característica muy relevante en las bacterias, tanto de aquellas que promueven el crecimiento vegetal como de aquellas que son fitopatógenas. Las plantas superiores producen aminoácidos, entre ellos el triptófano, el cual es principal precursor para la biosíntesis de ácido indolacético de origen microbiano.

Figura 6. Forma estructural de una molécula de ácido indolacético.



Las auxinas, entre ellas el ácido indolacético (AIA) juegan un papel muy importante en muchos procesos biológicos que inducen la división celular, diferenciación vascular, desarrollo de las plantas, etc. [64].

Una de las vías principales para la producción de esta fitohormona es por la vía indol- 3-piruvato (IPA). En esta la primera fase, el triptófano se convierte en ácido indol-3- pirúvico (IPA) a través de una aminotransferasa. Posteriormente, el IPA se descarboxila en ácido indol-3-acetaldehído (AIAld) a través de la enzima indol-3-piruvato descarboxilasa (IPDC), la cual limita en proceso de síntesis. Finalmente, el AIAld es oxidado a AIA por la indol-3-acetaldehído deshidrogenasa ([65].

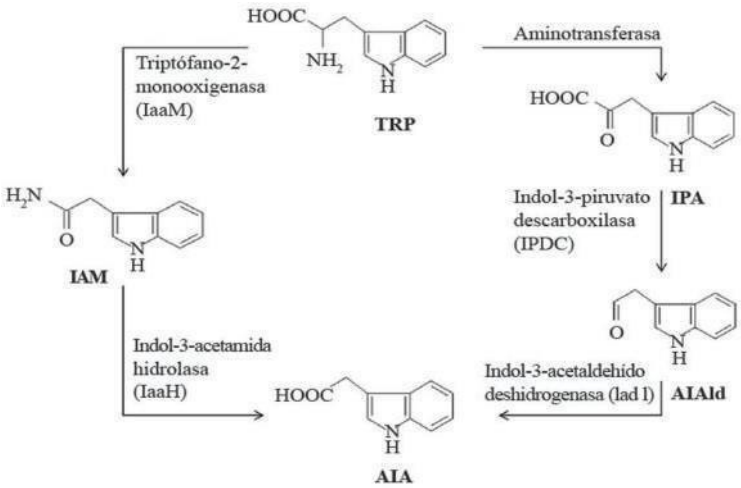


Figura 7. Bioquímica de la producción de ácido indolacético.
Fuente: Vega-Celedon P et al. [66].

2.2.9 Producción de antibióticos

Los biofertilizantes también juegan un papel esencial en la defensa de sus hospederos, a través de la síntesis de diferentes sustancias que funcionan como antibióticos contra microorganismos patógenos [67], previniendo la captación de hierro por parte de los microorganismos patógenos, a través de los sideróforos, limitando así su disponibilidad.

2.2.10 Fotosíntesis

Las plantas que son cultivadas con ayuda de los biofertilizantes muestran un aumento de la biomasa cuando se compara con aquellas que no fueron cultivadas con biofertilizantes, ello se explica porque los biofertilizantes aumentan la capacidad fotosintética en las plantas [68].

2.2.11 Biorremediación

El desmedido uso de fertilizantes químicos, la industrialización de los suelos por parte de la agricultura y otras actividades industriales, han conducido a una contaminación de los suelos con metales pesados, tales como el cadmio, plomo, arsénico, níquel, cobre, etc. que mayormente son solubles y que cuando lixivian, contaminan los suelos y aguas subterráneas. A pesar de que estos metales son necesarios para las plantas, su excesiva concentración, producto de la contaminación, provocan que las plantas no crezcan adecuadamente e incluso mueran.

Algunos biofertilizantes a través de los sideróforos quelan estos cationes formando complejos estables que mitigan el efecto tóxico de estos metales pesados ([69].

2.2.12 Género Azotobacter

Azotobacter sp es un género de bacterias Gram-negativas, aeróbicas y de vida libre que las podemos encontrar en los suelos. Su morfología es oval o esférica que suelen formar quistes o paredes gruesas en medios de cultivo viejos o ser inducidos por butanol. Existen aproximadamente 6 especies de *Azotobacter sp.,* de las cuales algunas presentan flagelos y otras no. Son típicamente

polimórficos, variando su morfología desde bacilos hasta células en forma de cocos. Su tamaño varía entre 2- 10 μm de longitud y 1-2 μm de ancho.

El *Azotobacter sp.* es sensible al pH ácido, asimismo a las altas concentraciones de sales y elevadas temperaturas. Se reproducen por fisión binaria y tienen la propiedad de asimilar el nitrógeno del medio ambiente para la producción de proteínas, clorofila y ácidos nucleicos. Luego de su muerte, el nitrógeno es incorporado al suelo para el posterior desarrollo de las plantas. Aparte de la fijación de nitrógeno *Azotobacter sp.* produce tiamina, riboflavina, nicotina, ácido indolacético, auxinas, citoquininas y giberalinas, que contribuye a una germinación mejorada de las semillas y diferenciación de las plantas [(70)].

Su presencia en los suelos depende de muchos factores como la materia orgánica, pH adecuado, temperatura y humedad. Son quimioorganotrofos que utilizan los compuestos orgánicos como fuentes de carbono, tales como: azúcares, compuestos aromáticos, alcoholes y sales inorgánicas para su desarrollo.

Según Kumar S et al. (2012)[(25)] son excelentes fijadores de nitrógeno atmosférico a través de las enzimas nitrogenasas que poseen en su citosol y dependiendo de la presencia de Vanadio o Molibdeno en el medio, expresan tres tipos de nitrogenasas: Nitrogenasa I en presencia de Molibdeno, Nitrogenasa II en presencia de Vanadio y Nitrogenasa III en ausencia de ambos.

En vida libre fijan al menos 10 mg de N_2 por gramo de carbohidrato (glucosa) consumido. Utilizan nitrato, sales de amonio y ciertos aminoácidos como fuentes de nitrógeno. Son catalasa positivos. El rango de pH en el que crecen en presencia de nitrógeno combinado es 4.8 - 8.5 y el pH óptimo para crecer cuando fijan nitrógeno es 7.0 - 7.5.

El *Azotobacter sp.* normalmente, se encuentra en suelos de pH neutro - alcalino, suelos no cultivados y su población es ínfima en las áreas cercanas a la rizosfera de las plantas.

2.2.13 Cultivo de *Azotobacter sp*.

Actualmente, la tecnología apunta al desarrollo de cultivos microbianos a través de biorreactores, donde las condiciones de cultivo están mejor controladas y se pueden establecer fácilmente las estrategias de cultivo que cada microorganismo necesita.

Mukhtar H et al. (2018)[71] indican las siguientes condiciones de cultivo que afectan el crecimiento de *Azotobacter sp*:

- **Temperatura** – *Azotobacter sp* es sensible a temperaturas por encima de 35ºC, siendo la ideal una temperatura de 30ºC; ligeras variaciones en la temperatura provocan un aumento en la velocidad de crecimiento.
- **pH** – pH ácidos afectan el desarrollo de Azotobacter *sp*, siendo un pH cercano al neutro el ideal, siendo un pH por debajo de 6 inadecuados.
- **Fuente de carbono –** *Azotobacter sp* muestra un buen crecimiento en medios libres de nitrógeno y que contengan glucosa y acetato como fuentes de carbono y es preciso modular la concentración porque un exceso producirá la aparición indeseable de subproductos.
- **Periodo de incubación** – Distintos estudios indican que *Azotobacter sp* muestran su máximo crecimiento entre 24 a 120hrs.
- **Concentración de sales** – Altas concentraciones de sales en el medio también afectan el crecimiento ideal de *Azotobacter sp* según señalan Damir O et al. (2011)[39].
- **Velocidad de agitación –** La velocidad de crecimiento es afectada por la velocidad de agitación, donde se evidencia que a mayor agitación el aumento de biomasa se ve favorecido.

El método de cultivo es otra variable a considerar para definir cuál es la mejor estrategia.

Cultivo continuo, donde se va agregando el medio al biorreactor a medida que la biomasa o los metabolitos de interés se van removiendo del sistema. De ese modo, el crecimiento o producción de metabolitos de interés se puede mantener estable por mucho tiempo. En un cultivo continuo, los

términos Lag-phase, Log-phase, fase estacionaria y de muerte pierden significado porque el sistema opera continuamente y no puede ser separado en fases.

Cultivo Fed-Batch, es un cultivo en sistema cerrado donde la cantidad de nutrientes están limitados y las células o microorganismos entran a un periodo de adaptación (lag-phase), para seguidamente experimentar un crecimiento vertiginoso (Log-phase) hasta una fase de desaceleración por falta de nutrientes o liberación de subproductos propios del metabolismo que detienen el crecimiento entrando a una fase estacionaria para posteriormente entrar a una fase de decrecimiento o fase de muerte.

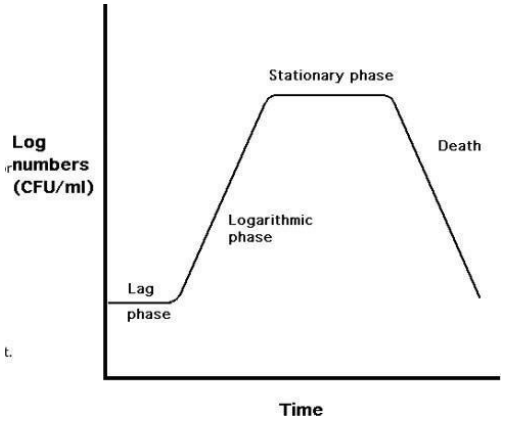


Figura 8. Ciclo de cultivo microbiano.
Fuente: Wang L et al. [72]

A diferencia de un cultivo por lote o batch, los nutrientes se van agregando a medida que estos se van consumiendo en el tiempo, de esta forma se logra que se obtenga la mayor biomasa posible en la fase de crecimiento exponencial.

Cultivos por lote o Batch, en este cultivo los microorganismos son inoculados a un volumen definido en un fermentador, donde los sustratos son consumidos continuamente y se acumulan subproductos, cambiando la composición química del medio a tal punto que se llega a la fase de muerte, donde la densidad celular cae. Yang Y et al. (2019)[73] señalan que la desventaja de este método es que se logran bajas densidades celulares,

pero que sirve para ir determinando las mejores condiciones de cultivo de los microorganismos.

Según Crater J et al. (2018)[74] los procesos de cultivo en biorreactores deben llevarse a cabo por lo general en 2 etapas:

A escala piloto – A fin de conocer mejor el proceso y las variables que afectan el proceso de cultivo antes de ir a una escala mayor.

A escala industrial – Se replican las condiciones establecidas en el laboratorio con los ajustes necesarios para su escalamiento.

2.2.14 Escalamiento

El objetivo de escalar un proceso de fermentación es obtener la mayor cantidad de biomasa, con las mismas características que se obtuvieron en el laboratorio. El paso del cultivo en frascos agitados a biorreactores representa el primer paso hacia el cultivo a escala, donde se hace necesario extrapolar las condiciones empleadas en frascos agitados hacia un biorreactor o tanque agitado. Según García-Ochoa F et al. (2009)[75] y Quiroga-Cubide G et al. (2017)[76] las variables que pueden afectar el proceso de escalamiento son:

- La geometría de los tanques.
- Velocidad de agitación.
- Transferencia de oxígeno.
- Transferencia de calor.
- Evitar el stress de las células.
- Medición de las gradientes de nutrientes o suplementos, etc
- Dinámica de los fluidos.

La mayoría de los procesos de fermentación son aeróbicos y estos se llevan a cabo en medios acuosos que, durante el proceso de cultivo, se van densificando debido al aumento de la biomasa y de los subproductos propios del metabolismo de los microorganismos. Estos medios van mostrando un comportamiento no-newtoniano porque su viscosidad y/o densidad van variando en el tiempo, dificultando la transferencia de oxígeno hacia los microorganismos; para minimizar su impacto se desarrollan distintas

estrategias. El coeficiente volumétrico de transferencia de oxígeno (K_La) es uno de los criterios que se sigue para determinar si el oxígeno llega a los microorganismos en cantidades suficientes a fin de favorecer su crecimiento y desarrollo. Trujillo-Roldan M et al. (2013)[77] señalan la importancia de determinar el K_La a nivel de frascos agitados y mantenerlo en la fase de escalamiento, para lo cual se realizan ajustes en cuanto a la velocidad de agitación y volúmenes de aireación que inciden directamente la variación de sus valores y facilitar el escalamiento de cultivos que son sensibles a los cambios bruscos de oxígeno disuelto, como es el caso de *Azotobacter sp*.

Según lo expuesto es importante identificar las condiciones que influyen en el proceso y su control durante la fase de escalamiento.

III. METODOLOGÍA

3.1 Tipo y diseño de investigación:

La metodología de la investigación presenta un tipo de diseño experimental. Se trabajaron variables independientes para lograr la mejor expresión de la variable dependiente. En este caso, la producción a escala de laboratorio de *Azotobacter sp.* diseño transversal correlacional para determinar las relaciones entre las variables seleccionadas.

3.2 Unidad de análisis

Células procariotas del género *Azotobacter sp.* con capacidad para fertilizar suelos de cultivos cafetaleros.

3.3 Población de estudio

Microorganismos provenientes de los suelos cafetaleros de Rioja, provincia del departamento de San Martin.

3.4 Tamaño de la muestra

Fueron 15 muestras aleatoriamente tomadas en una hectárea de área superficial.

3.5 Diseño metodológico

3.5.1 Muestreo

Las muestras fueron recolectadas en Rioja, provincia del departamento de San Martín. Se recolectaron en suelos cercanos al área rizosferica de los cafetos y a 20 cm de hondura. Para el muestreo, se segmentó una hectárea del área a muestrear en 20 segmentos, en cada uno de ellos se colectaron los especímenes siguiendo un patrón tipo zig-zag. Las muestras pesaron aproximadamente 100 g, las cuales fueron colectadas y depositadas en contenedores estériles, para evitar la contaminación con elementos foráneos. Las muestras colectadas se depositaron en recipientes de tecnopor a 2-5ºC, con el auxilio de hielo seco para su traslado al laboratorio y su posterior tratamiento [78].

3.5.2 Aislamiento de microorganismos

3.5.2.1 Pre-enriquecimiento

Las muestras fueron tamizadas para obtener un polvo fino de la muestra colectada. Se transfirió 10 g de este polvo fino, a un matraz de Erlenmeyer con 90 mL de caldo Winogradsky, previamente esterilizado.

Luego, se incubó a una temperatura de 30ºC con agitación continua a 150 RPM por 92 horas [79].

3.5.2.2 Aislamiento de las cepas de *Azotobacter sp*

De acuerdo a Borda-Molina D et al. (2009)[78], concluida la etapa de pre-enriquecimiento, se procedió a diluir 1 mL de la solución enriquecida en un tubo con 9 mL de solución salina (0.98%), constituyendo está la solución 10^{-1} diluyéndose en serie hasta 10^{-7} para su posterior cultivo por diseminación en placas en Agar Ashby (manitol, fosfato dipotásico, sulfato de magnesio, cloruro de sodio, sulfato de potasio, carbonato de calcio y agar). La incubación de las placas se realizó a una temperatura de 28°C por 5 días hasta la obtención de las mejores colonias de *Azotobacter sp*.

3.5.2.3 Descripción y caracterización bioquímica

Siguiendo la metodología de Jaramillo Liz (2012)[80], se describió macroscópicamente la morfología de las colonias en cuanto a su tamaño, color y borde. Se aplicó la coloración Gram y las pruebas de oxidasa, catalasa y Ashby + benzoato.

A la cepa seleccionada (colonias grandes, viscosas, bacilos Gram negativos, producción de pigmentos, motilidad positiva), se le realizaron las siguientes pruebas de caracterización bioquímica: ureasa, glucosa, manitol y lactosa.

3.5.2.4 Sistema de conservación de cepas

Las cepas aisladas fueron conservadas de dos maneras: los ceparios de trabajo en 5 mL de TSA (Agar Soja Tripticasa) y los ceparios de conservación mediante el método de crío preservación en crioviales con TSA semisólido a -20°C utilizando glicerol al 25% (v/v) como agente crio protector [81].

3.5.3 Evaluación de la capacidad diazotrófica de las cepas aisladas

3.5.3.1 Determinación de la fijación biológica de nitrógeno

Para las pruebas cuantitativas de cuantificación de nitrógeno (mg/L), se reactivaron los microorganismos conservados en caldo soja tripticasa de 18-24 horas, con el fin de obtener células viables en plena fase exponencial.

Una vez activada, la cepa se inoculó en 20 mL de medio de Burk, y se incubó a 28°C por 72 horas a 120 RPM.

La elaboración de la curva patrón con $ClNH_4$, se realizó tomando concentraciones de 0.1, 0.4, 0.7, 0.9, 1.1, 1.3 ppm de $ClNH_4$, y se midió a 632.9 nm.

Concluido el periodo de incubación, se añadieron los reactivos reveladores, antes se centrifugó la muestra a 2500 RPM por 20 minutos, se recuperó el sobrenadante y se añadió cloruro de potasio 2M y luego se dejó reposar por 1 hora.

Los reactivos se añadieron en la siguiente secuencia: fenol alcohólico al 10% (0.08 mL), sodio nitroprusiato al 0.5% (0.08 mL) y solución oxidante constituida por sodio hipoclorito, sodio hidróxido y sodio citrato (0.2mL).

Se dejó reposar durante 1 hora y luego se leyó en un espectrofotómetro UV/visible a 632.9 nm utilizando el software MetaSpecPro [82] .

Tabla 2.- Concentraciones medidas para realizar la curva patrón a 632.9 nm.

0.1 ppm	ABS 1
0.4 ppm	ABS 2
0.7 ppm	ABS 3
0.9 ppm	ABS 4
1.1 ppm	ABS 5
1.3 ppm	ABS 6

3.5.3.2 Determinación de producción de ácido indolacético

Para las pruebas cuantitativas de ácido indolacetico se inició con la reactivación de las cepas en caldo tripticasa de soja por 18-24 horas a fin de tener células viables en plena fase exponencial.

Una vez crecida la cepa se procedió a su inoculación en 20 mL de caldo triptófano (peptona de caseína, cloruro de sodio, extracto de levadura, extracto de carne y L-triptofano), se incubó a una temperatura de 28°C por 72 horas a 120 RPM.

Mediante análisis colorimétrico, se añadió 1 mL del reactivo de Salkowski (cloruro férrico y ácido sulfúrico 18M) [83].

Posteriormente, se midió su absorbancia en un espectrofotómetro UV/visible a 530 nm donde se utilizó el software MetaSpecPro, según técnica indicada por Escobar C et al. (2011)[21].

Tabla 3. Concentraciones usadas para la elaboración de la curva patrón

5 ppm	ABS 1
10 ppm	ABS 2
15 ppm	ABS 3
20 ppm	ABS 4
25 ppm	ABS 5
30 ppm	ABS 6

3.5.3.3 Determinación de la solubilización de fosfatos

Las cepas se sembraron en caldos de tripticasa para su reactivación. Posteriormente, fueron sembradas mediante la técnica de moteado en placas en agar Sundara Rao Sinha SRSM con fosfato tricálcico como fuente de ortofosfatos.

Se consideró positivo para la solubilización el cambio de color del indicador púrpura a amarillo y la formación de un halo translúcido alrededor de la colonia después de una incubación a 28 °C por 4 días. Se calculó el índice de solubilización por la siguiente fórmula:

$$\text{Indice de solubilización} = \frac{\text{(Diametro de la colonia + halo)}}{\text{Diametro de la colonia}}$$

Siendo: D: diámetro de la colonia + halo

d: diámetro de la colonia

Fuente: Ishak F et al. [84]

Paralelamente, se sembró en agar Pikovskaya con fosfato monocálcico como fuente de fosfato y se incubó por 14 días a 28°C. Para ello se inoculó por el método del moteado depositando una gota de 10 µL del caldo TSB con la cepa reactivada, dejando secar la microgota por 30 minutos y posteriormente se incubó por 14 días a 28°C [85].

Con las mejores cepas se cuantificó ortofosfato en un medio soluble. Para ello, se realizó la reactivación de la cepa en medio TSB por 24 h. Se transfirió a un medio líquido Pikovskaya por 14 días a una temperatura de 28°C y agitado a 120 RPM.

Pasado el periodo de incubación, se centrifugaron 10 mL del cultivo, y se recuperaron el sobrenadante y filtrado. La lectura se ejecutó con un Test de cuantificación directa de Orthophosphate HACH Test-Kit model PO-19, se evidenció la lectura positiva con un viraje a color azul. La intensidad del color estuvo en relación con la concentración de ortofosfatos en el medio.

3.5.4 Optimización de las variables para la obtención de biomasa.

Las variables de impacto directo en el crecimiento y desarrollo de los microorganismos (pH, agitación, oxígeno, temperatura) fueron evaluados mediante los cultivos llevados a cabo en un biorreactor elegido para el efecto.

Luego, mediante la evaluación de los resultados obtenidos se determinó la mejor combinación de variables para la producción de biomasa en el laboratorio [78].

Los parámetros seleccionados para dicho ensayo fueron el potencial de hidrogeniones y la temperatura. En tanto, los parámetros de agitación y aireación fueron manejados en automático en función a la cantidad de oxígeno disuelto programado como valor estándar.

El biorreactor seleccionado para el desarrollo de los bioprocesos fue el modelo Sartorius Biostat® A MO UniVessel® Glass con una capacidad operativa de 2L. El número de ensayos o fermentaciones fue determinado por los siguientes valores de cada parámetro seleccionado.

Tabla 4. Aleatorización de las variables empleadas en la producción y optimización de biomasa de *Azotobacter sp*.

Velocidad		T1	T2
80 RPM	pH 1		
	pH 2		
120 RPM	pH 1		
	pH 2		

3.5.4.1 Reactivación de la cepa e inoculación.

Según metodología implementada por Escobar C et al. (2011) [21], la cepa seleccionada fue reactivada en 2 mL de caldo TSB a 28°C durante 48 horas. Posteriormente, fue sembrada en un tubo de ensayo con 10 mL de medio TSB a 30°C por 24 horas, al cabo del cual fue vertido todo el cultivo en 90 mL de medio TSB estéril e incubado a 30°C por 24 horas, lo que constituyó él inoculó para el proceso.

En el biorreactor Biostat A se preparó con 900 mL de medio TSB. Luego se procedió a esterilizar a 15 Psi de presión, a 121°C y por 15 minutos.

Una vez enfriado el medio, se procedió en la cabina microbiológica a inocular los microorganismos con ayuda de una bomba peristáltica.

3.5.4.2 Programación del Biorreactor.

Después de la etapa de inoculación se procedió a programar el biorreactor con los valores diseñados para la determinación de parámetros.

Para el primer proceso se programaron con los siguientes valores:

Oxígeno disuelto	80%
Agitación	80 RPM
	120 RPM
Aireación	1 VVM
	1 VVM
Tiempo	10 - 18 horas

Tabla 5.- Parámetros establecidos en el bioreactor.

VVM = Vessel volumes per minute (vvm)
= caudal de aire / volumen operativo

3.5.4.3 Evaluación de la biomasa

Siguiendo el procedimiendo aplicado por Jiménez Victor (2007) [86], el proceso fue iniciado con el T_0, se tomaron 2 mL de muestra del medio de cultivo homogeneizado. Fue centrifugado a 2500 RPM y se realizó un lavado celular con solución salina 0.85%, procedimiento realizado dos veces. Esta muestra fue utilizada para determinar la biomasa inicial, mediante espectrofotometría a 600 nm, en un espectrofotómetro UV Visible Modelo UV – VIS 5200, serie N° AF 1801005. El procedimiento se repitió cada dos horas hasta completar las 30 horas programadas.

3.5.4.4 Selección de la cepa con mejor performance

Para la selección de la cepa de estudio se llevó a cabo una caracterización según León L et al. (2015)[87] tanto macroscópica como microscópicamente, pruebas de tinción Gram para discernir si estábamos frente a posibles cepas del género *Azotobacter sp.* Así mismo, se evaluaron los

resultados obtenidos en las pruebas indicadas en el acápite 3.2.3, que para el efecto fue la cepa 1F que mostró la mejor performance respecto a las demás cepas evaluadas en el presente estudio.

3.5.4.5 Elaboración de la curva patrón

De las colonias aisladas, se sustrajeron 5 mL del medio de cultivo homogeneizado cuando finalizó la fase exponencial y posteriormente se realizaron las diluciones de la suspensión madre.

- De la muestra 1 (5 mL), se sustrajo la mitad (2.5 mL), se diluyó en otro tubo con 2.5 mL de TSB y se obtuvo así la dilución (1/2).
- A partir de esta dilución se empezó a hacer una serie de diluciones siguiendo los pasos de la siguiente tabla. Progresivamente, se obtuvieron los tiempos patrón de la fase exponencial hasta (1/64).
- A estas nuevas diluciones se les denominó Suspensión de Trabajo (ST).

Tabla 6.- Elaboración de la curva patrón de las UFC en la cinética de crecimiento

Tubo	1	2	3	4	5	6	7
Tiempo (horas)	6	5	4	3	2	1	0
Dilución (ST)	1	1/2	1/4	1/8	1/16	1/32	1/64
Dilución sembrada	-4/-5	-4/-5	-4/-5	-4/-5	-4/-5	-4/-5	-4/-5

* 2 últimas diluciones sereadas (1/32 y 1/64), -4: colonias incontables,
-5: (30 – 300 UFC), -6: < 10 UFC.

- Se obtuvo, por lo tanto, la biomasa en cada uno de los puntos seleccionados. Se realizaron las mediciones al espectrofotómetro a 600 nm por triplicado.

- Cada uno de los puntos fueron diluidos en 9 mL de solución salina (0.85% NaCl) hasta 10^{-7} y se obtuvieron diluciones seriadas, las cuales fueron sembradas en placas de TSA las diluciones 10^{-5}, 10^{-6}, 10^{-7}.

- Recuento de las UFC entre 30 a 300 de células viables (recuento en placa ufc), según la siguiente fórmula:

$$\text{UFC/mL} = \frac{(\text{\# de colonias})\,(\text{inverso del factor de dilución})}{\text{Volumen sembrado en placas}}$$

La gráfica de la curva patrón se realizó tomando las absorbancias medidas (ordenadas) y el recuento de las UFC (abscisas) de los respectivos tiempos, ajustando la recta lineal y teniendo un R^2 superior a 0.95.

Con base en los resultados obtenidos en cada una de las pruebas mencionadas, se seleccionó la cepa 1F por presentar la mejor performance respecto a las demás cepas evaluadas. Posteriormente, se procedió a llevar a cabo los cultivos en un biorreactor y se evaluaron las diferentes variables que afectaron su crecimiento.

3.6 Técnicas e instrumentos de recolección de la información de datos

Los datos utilizados fueron los que se recogieron de las observaciones hechas en los ensayos microbiológicos, lecturas que fueron emitidas por los equipos de medición y aquellos que resultaron de los análisis estadísticos.

En la zona de muestreo se ubicaron cafetales donde la probabilidad de encontrar cepas de *Azotobacter sp.* fueron altas y las muestras de tierra requeridas, fueron extraídas de aquellas que se encontraban muy próximas a la rizosfera de las plantas.

Para el efecto:

- Se segmentó la zona a muestrear en 10 cuadrantes (aprox 1/10 hectárea).
- La muestra fue tomada (aproximadamente 100 g) de la misma parte superficial del suelo y otro tanto a 20 cm de profundidad.
- Se colectaron las muestras empleando espátulas y bolsas estériles.
- Se almacenaron las muestras en una caja tecnopor refrigerada con hielo seco a una temperatura aproximada de 2 - 5°C.
- Las muestras fueron transportadas al laboratorio entre las 24 - 48 hrs después de realizado el muestreo. Fueron sembradas en agar nutricio y conservadas en refrigeración entre 2 - 5°C.

3.7 Procesamiento de la información o de datos

Se aplicaron análisis estadísticos como análisis factorial, análisis de superficie de respuesta, análisis ANOVA y Tukey para poder interpretar los resultados obtenidos y seleccionar de manera adecuada los mejores parámetros de producción de biomasa a escala. Las pruebas se ejecutaron a través del programa estadístico Minitab y Microsoft Excel.

IV. RESULTADOS

4.1 Aislamiento y caracterización de *Azotobacter sp.*

Se obtuvieron en total 25 cepas cultivadas en los medios Ashby y Winogradsky, de ellas un 72% de las colonias aisladas eran presuntivos para el género *Azotobacter* (con base a su morfología: colonias grandes y mucosas) en comparación de un 28% que representaban a otro tipo de género.

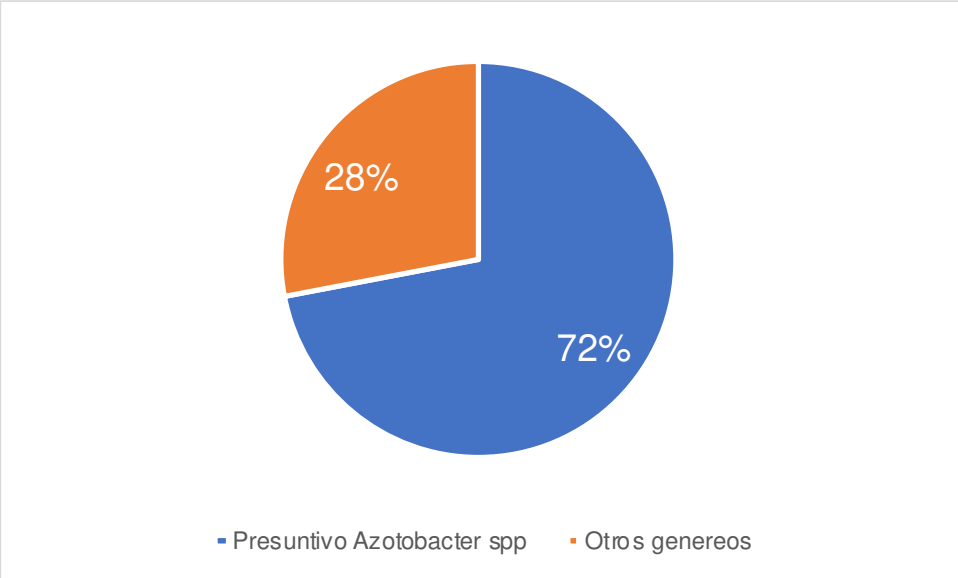


Figura 9. Porcentaje de cepas aisladas que coinciden con la morfología para el género *Azotobacter sp*.

Durante los siguientes pasajes de las cepas, se purificaron a través de pasajes sucesivos de las colonias por agotamiento por estriado cada 24 horas en placas con agar TSA y se guardaron en ceparios para asegurar su viabilidad.

Una vez codificada cada colonia bacteriana se realizó la descripción de características macroscópicas (Tabla 7) según el manual de Bergey.

Tabla 7.- Características de las macrocolonias aisladas.

Código	Morfología	Característica de la colonia
1A	bacilos	Forma: Irregular Elevación: Convexa Margen: Entero . Luz transmitida: Translúcida
2A	bacilos	Forma: Circular Elevación: Convexa Margen: Entero . Luz transmitida: Opaca
2B	bacilos	Forma: Circular Elevación: Convexa Margen: Entero . Luz transmitida: Translúcida
2C	bacilos	Forma: Circular Elevación: Plano - convexa Margen: Entero . Luz transmitida: Translúcida
2D	bacilos	Forma: Circular Elevación: Convexa Margen: Difuso . Luz transmitida: Opaca
2E	bacilos	Forma: Circular Elevación: Cóncava Margen: Entero . Luz transmitida: Translúcida
1K	bacilos	Forma: Circular Elevación: Convexa Margen: Entero . Luz transmitida: Translúcida
1J	bacilos	Forma: Circular Elevación: Convexa Margen: Entero . Luz transmitida: Translúcida
1N	bacilos	Forma: Irregular Elevación: Convexa Margen: Entero . Luz transmitida: Translúcida
2J	bacilos	Forma: Circular Elevación: Convexa Margen: Entero . Luz transmitida: Translúcida
1I	bacilos	Forma: Circular Elevación: Plana convexa Margen: Entero . Luz transmitida: Opaca
2G	coco-bacilos	Forma: Circular Elevación: Convexa Margen: Entero . Luz transmitida: Translúcida
2F	bacilos	Forma: Circular Elevación: Plano - convexa Margen: Entero . Luz transmitida: Translúcida
1D	bacilos	Forma: Circular Elevación: Convexa Margen: Entero . Luz transmitida: Opaca
2I	bacilos	Forma: Circular Elevación: Convexa Margen: Entero . Luz transmitida: Translúcida
1H	bacilos	Forma: Circular Elevación: Convexa Margen: Entero . Luz transmitida: Translúcida
1E	coco-bacilos	Forma: Circular Elevación: Plano - convexa Margen: Entero . Luz transmitida: Translúcida
1G	bacilos	Forma: Circular Elevación: Convexa Margen: Entero . Luz transmitida: Translúcida
1B	bacilos	Forma: Irregular Elevación: Convexa Margen: Entero . Luz transmitida: Translúcida
1C	bacilos	Forma: Circular Elevación: Convexa Margen: Entero . Luz transmitida: Opaca
2K	bacilos	Forma: Circular Elevación: Convexa Margen: Entero . Luz transmitida: Translúcida
1F	bacilos	Forma: Circular Elevación: Convexa Margen: Entero . Luz transmitida: Translúcida

1L	bacilos	Forma: Circular Elevación: Convexa Margen: Entero . Luz transmitida: Translúcida
1M	bacilos	Forma: Circular Elevación: Convexa Margen: Entero . Luz transmitida: Translúcida
2H	bacilos	Forma: Circular Elevación: Convexa Margen: Entero . Luz transmitida: Translúcida

A **B**

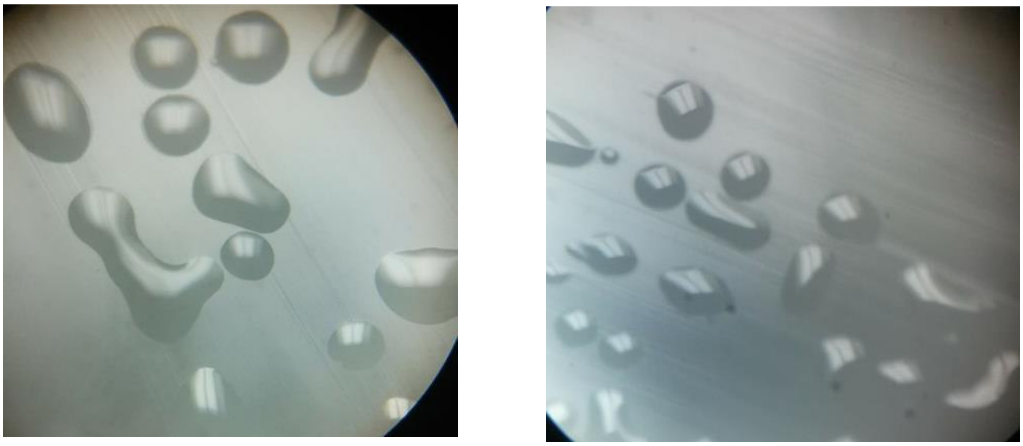


Figura 10. Macrocolonias de las cepas 1F (A) y 1G (B).

Se realizaron pruebas bioquímicas para determinar la presunción del género *Azotobacter sp*, descartando las cepas que no cumplan con las características mencionadas según el manual Bergey's (ver tabla N° 8), entre ellas metabolizar manitol.

A los microorganismos que resultaron presuntivos para *Azotobacter sp*, se les realizó las pruebas para demostrar su acción diazotrófica, es decir, que reduzcan el nitrógeno atmosférico a nitrógeno elemental para ser utilizado por las plantas.

Tabla 8.- Pruebas bioquímicas de las cepas aisladas con fuentes carbonadas Glucosa, Lactosa y Manitol (Bergeys, 1984)

BIOQUÍMICAS											
Cepas	**Gram**	**KOH**	**Ureasa**	**Oxidasa**	**Catalasa**	**Glucosa**		**Lactosa**		**Manitol**	
1A	-	+	+	+	+	+	+	-	-	d	+
2A	-	+	+	+	d	+	+	-	-	+	+
2B	-	+	+	+	+	+	d	-	-	+	d
2C	-	+	+	+	+	+	+	-	-	d	+
2D	-	+	d	-	+	d	+	-	-	+	+
2E	-	+	+	+	+	+	+	-	d	+	+
1K	+	-	-	+	+	d	+	+	+	-	-
1J	-	+	+	+	d	+	d	d	+	d	-
1N	+	-	d	+	+	+	+	+	+	d	-
2J	-	+	d	+	+	+	+	-	-	+	+
1I	-	+	+	+	+	+	d	-	-	+	d
2G	-	+	+	+	*	+	+	-	-	+	+
2F	-	+	+	+	+	+	+	d	-	d	+
1D	-	+	+	d	+	+	+	-	-	+	+
2I	-	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+
1H	-	+	+	-	+	d	+	-	-	+	+
1E	-	+	+	+	+	+	+	-	-	+	d
1G	-	+	+	+	+	+	+	d	-	+	+
1B	-	+	d	+	+	+	+	+	+	-	-
1C	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-
2K	-	+	+	+	d	+	d	-	-	+	+
1F	-	+	+	+	+	+	+	-	-	+	d
1L	+	-	+	+	+	+	+	+	d	-	-
1M	+	-	-	d	+	+	+	+	+	-	-
2H	-	+	d	-	+	+	d	+	+	d	-

Figura 11. Pruebas bioquímicas en medio basal de Thompson con fuente carbonada manitol (Bergeys, 1984)



Figura 12. Pruebas bioquímicas en medio basal de Thompson con fuente carbonada glucosa (Bergeys, 1984)

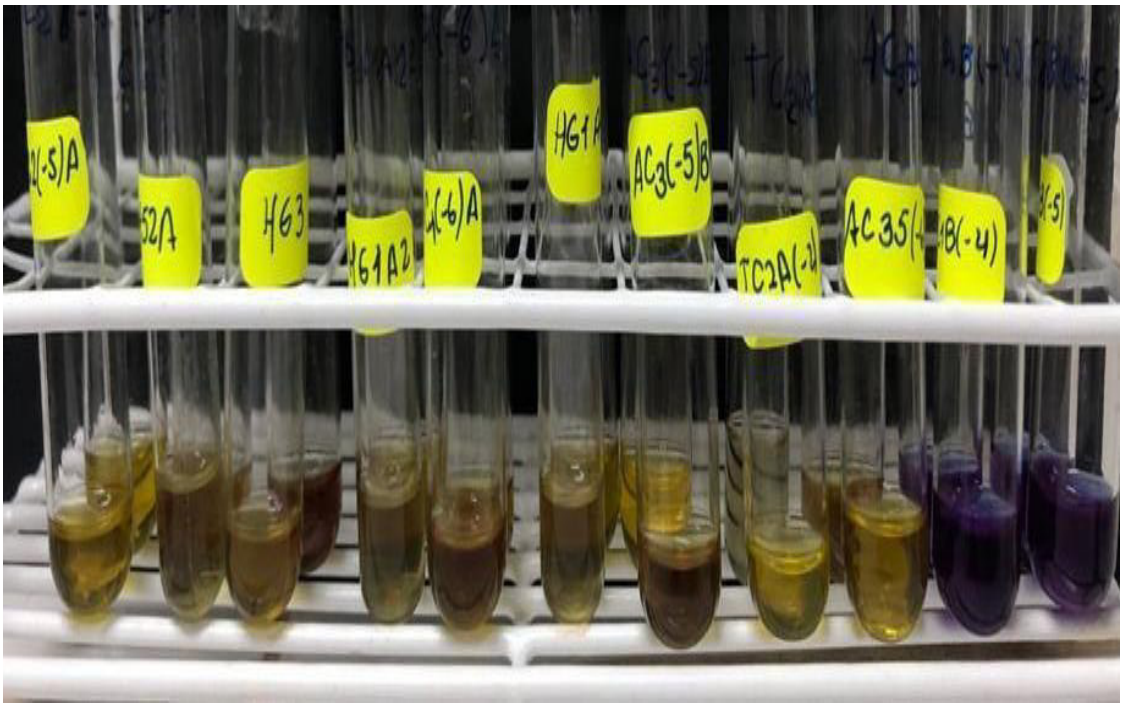
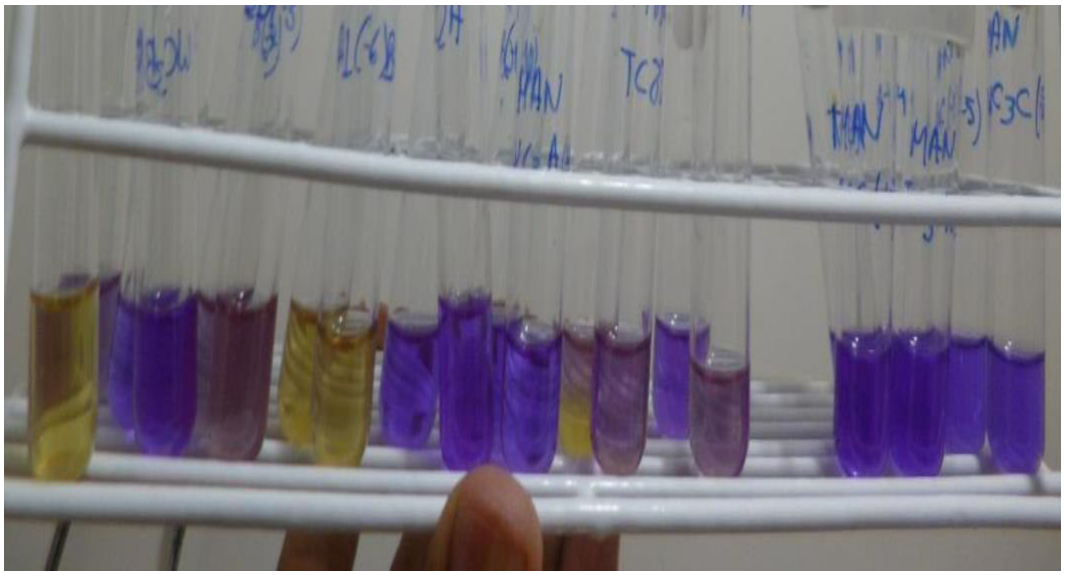


Figura 13. Pruebas bioquímicas en medio basal de Thompson con fuente lactosa glucosa (Bergeys, 1984)



De las 25 cepas aisladas, solo 18 cepas resultaron presuntivas para el género *Azotobacter sp*, Gram-negativo, positivos para oxidasa, catalasa, para los carbohidratos, manitol y glucosa, y negativo para el carbohidrato lactosa (Bergeys, 1984).

4.2 Evaluación de las capacidades diazotroficas de las cepas aisladas:

4.2.1 Determinación de fijación biológica de nitrógeno

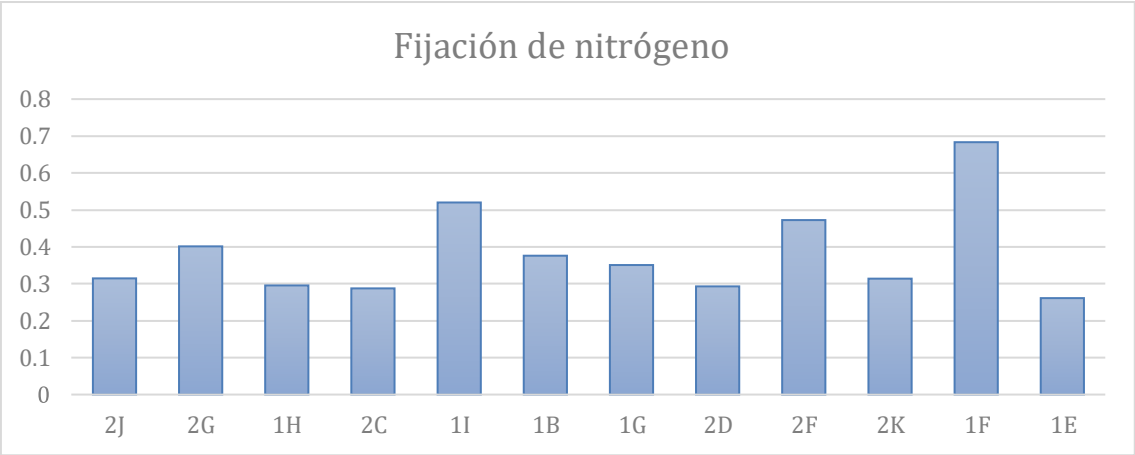
Se determinaron las concentraciones fijadas de nitrógeno atmosférico, midiendo la concentración de amonio (NH_3), previamente se determinó la curva patrón a partir de concentraciones de $ClNH_4$ para extrapolar las absorbancias medidas en el ensayo.

En el medio de Burk se diluye la cepa (3 - 5 días) y luego por centrifugación se obtiene el sobrenadante con el amonio. Luego se toman 2 mL de sobrenadante en un tubo + nitroprusiato de sodio 0.5% + solución alcohólica de fenol 10% + solución oxidante (hidróxido de sodio + citrato de sodio + hipoclorito de sodio) por triplicado.

Tabla 9. Cepas con las concentraciones más altas de nitrogéno fijado.

Código	Absorbancia	Transmitancia	Promedio ABS	y=0.2317X+0.045
2J	0.298	50.3553	0.3145	1.1631
2J	0.3215	47.6928		
2J	0.324	47.4228		
2G	0.4427	36.0811	0.4011	1.5370
2G	0.391	40.6481		
2G	0.3697	42.6852		
1H	0.297	50.4643	0.2952	1.0798
1H	0.288	51.5255		
1H	0.3006	50.0521		
2C	0.3151	48.4034	0.2873	1.0456
2C	0.2615	54.7612		
2C	0.2852	51.8619		
1I	0.5187	30.2918	0.5199	2.0496
1I	0.5464	28.4205		
1I	0.4946	32.021		
1B	0.3519	44.4713	0.3759	1.4280
1B	0.375	42.1736		
1B	0.4007	39.7432		
1G	0.3194	47.9344	0.3506	1.3189
1G	0.3526	44.4002		
1G	0.3798	41.7093		
2D	0.2805	52.4209	0.2927	1.0689
2D	0.2798	52.5014		
2D	0.3177	48.1192		
2F	0.4859	32.6653	0.4725	1.8451
2F	0.5066	31.1446		
2F	0.425	37.5876		
2K	0.3104	48.9341	0.3137	1.1597
2K	0.3193	47.9392		
2K	0.3114	48.8251		
1F	0.689	20.4662	0.6833	2.7547
1F	0.6828	20.7599		
1F	0.678	20.9873		
1E	0.2419	57.2863	0.2610	0.9322
1E	0.276	52.9657		
1E	0.2651	54.3112		

Figura 14. Prueba de fijación de nitrogéno



4.2.2 Determinación de producción de ácido indolacético

Se determinaron las concentraciones de ácido indolacético producido. Previamente, se determinó la curva patrón a partir de concentraciones de ácido indolacético sintético (HIMEDIA, PC0803-25G $C_{10}H_9NO_2$) paraextrapolar las absorbancias medidas en la prueba colorimétrica.

Tabla 10. Evaluación de la producción de ácido indolacético de las cepas presuntivas de *Azotobacter* aisladas

Código	Absorbancia	Media	Y= 0.0551X+0.0134
1A	1.3269	1.135	20.356
1A	1.0633		
1A	1.0158		
2D	3.1772	2.463	44.457
2D	2.161		
2D	2.0507		
1I	1.955	2.908	33.631
1I	2.440		
1I	2.2043		
1G	2.7565	2.908	52.526
1G	3.0132		
1G	2.9531		

1F	2.9456	3.042	54.972
1F	3.1254		
1F	3.0561		
1E	1.4111	1.319	23.688
1E	1.2614		
1E	1.2833		
2G	1.4071	1.396	25.100
2G	1.432		
2G	1.3501		
2C	0.8282	0.841	15.013
2C	0.853		
2C	0.847		
2K	1.0552	1.19	21.356
2K	1.325		
2k	1.145		
2J	1.1748	1.174	21.057
2J	1.1725		
2J	1.1698		
2F	0.8388	0.864	15.430
2F	0.8884		
2F	0.8752		

Las cepas de mayor crecimiento muestran también una mayor producción de ácido indolacético soluble, siendo las cepas 1F y 1G con 54.972 mgL^{-1} y 52.526 mgL^{-1}, respectivamente.

Figura 15. Prueba producción de ácido indolacético

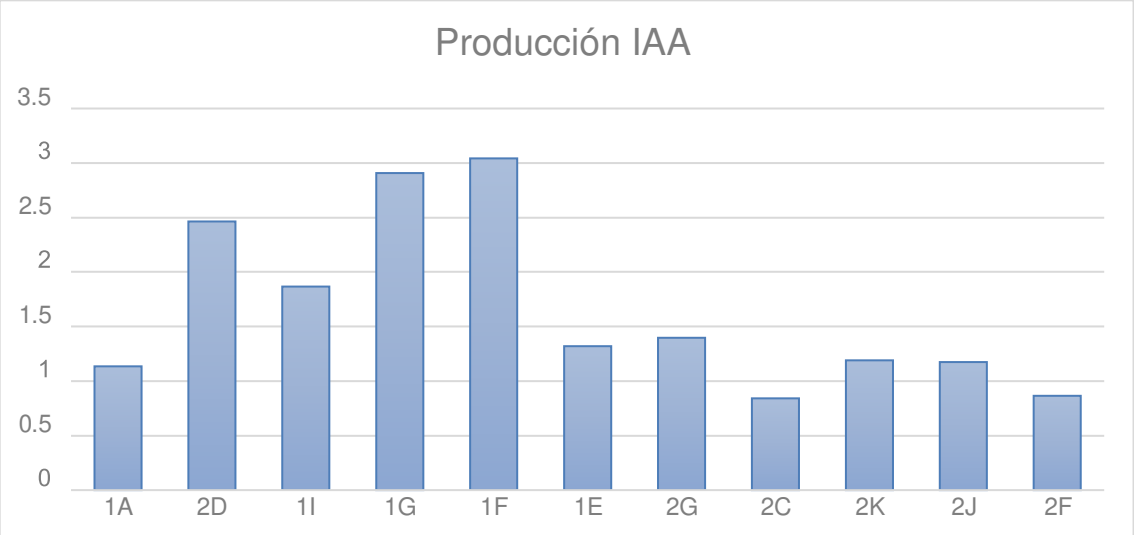


Figura 16. Prueba colórimetrica utilizando reactivo de Salkowski en caldo triptófano



4.2.3 Determinación de solubilización de fosfatos

Se determinó la solubilización de fosfatos con el medio SMRS (Sundara Rao & Sinha). Resultandos positivos, mostrando halos de color amarillo debido al aumento de la acidez alrededor de la colonia bacteriana. Se muestran los promedios de las mediciones por día.

Tabla 11. Medio SMRS. +: Halo amarillo. -: Sin halo. D: diámetro de colonia + halo. d: diámetro de la colonia. IS: índice de solubilización.

Medio SMRS 1				
CEPA	**HALO**	**4d**		
		D	**d**	**IS**
1H	-	-	-	-
2E	+	0.9	0.3	2.5
1D	-	-	-	-
2I	-	-	-	-
2C	+	0.8	0.5	1.7
1A	+	0.9	0.7	1.3
2K	+	1.8	0.6	2.8
1F	+	2.1	0.7	3
2D	+	1.4	0.5	3
1E	+	2.2	1.0	2.1
2A	-	-	-	-
2G	+	1.3	0.7	2
2F	+	1.3	0.7	2
2J	+	1	0.5	2
2B	-	-	-	-
1G	+	1.5	0.6	2.5
1I	+	1.7	1.5	1.1

A B

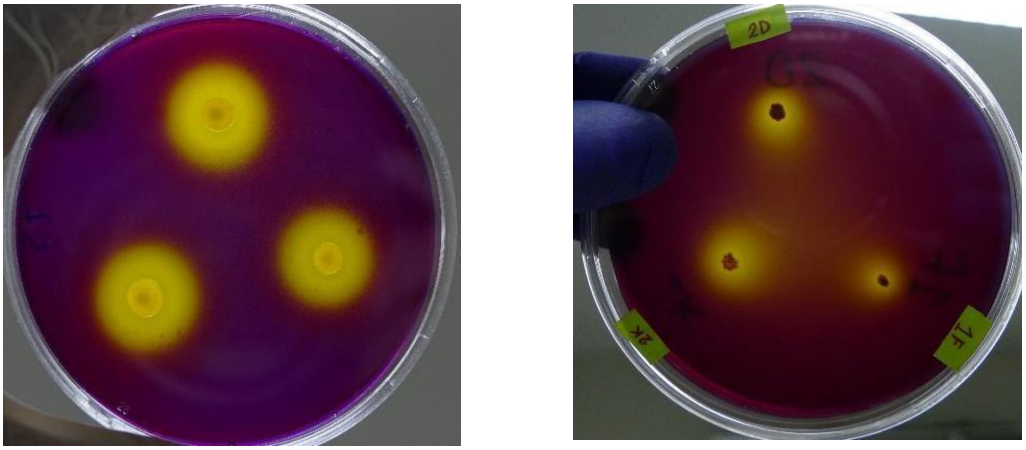


Figura 17. Presencia de halos concéntricos amarillos alrededor de la colonia.

A: cepa 1F B: cepa 2D, 2A y 1L

Se determinó la solubilización de fosfatos con el medio Pikovskaya resultando positivos, mostrando halos translúcidos alrededor de la colonia bacteriana.

Se muestran los promedios de las mediciones por triplicado por día.

Tabla 12. Medio PIKOVSKAYA. +: Halo amarillo. -: Sin halo. D: diámetro de colonia + halo. d: diámetro de la colonia. IS: índice de solubilización

Medio PIKOVSKAYA				
CEPA	**HALO**	**14 días**		
		D	**d**	**IS**
1H	-	-	-	-
2E	+	1.2	0.9	1.3
1D	-	-	-	-
2I	+	1.4	1	1.4
2C	+	1.4	0.9	1.6
1A	+	1.3	0.9	1.4
2K	-	-	-	-
1F	+	1.2	0.9	1.3
2D	+	1.2	0.9	1.3

1E	+	1.1	1	1.1
2A	-	-	-	-
2G	+	1.3	0.9	1.4
2F	+	1.3	0.8	1.6
2J	+	1.2	1	1.2
2B	+	1.2	0.9	1.3
1G	+	1.4	0.9	1.6
1I	+	1	0.95	1.1

Figura 18. Prueba de solubilización de fosfatos en medio Pikovskaya

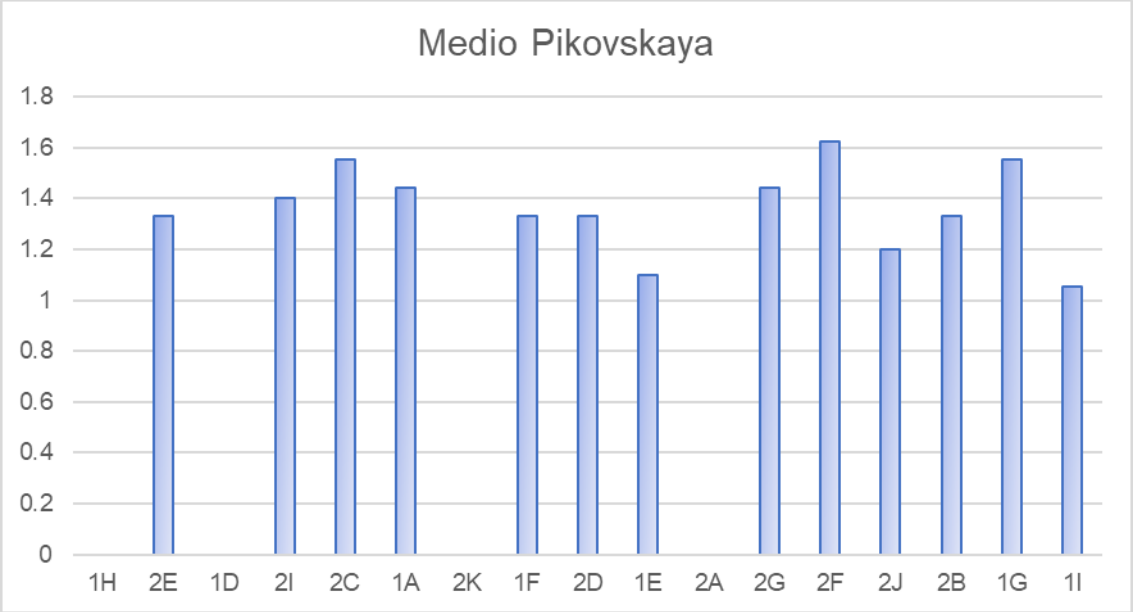
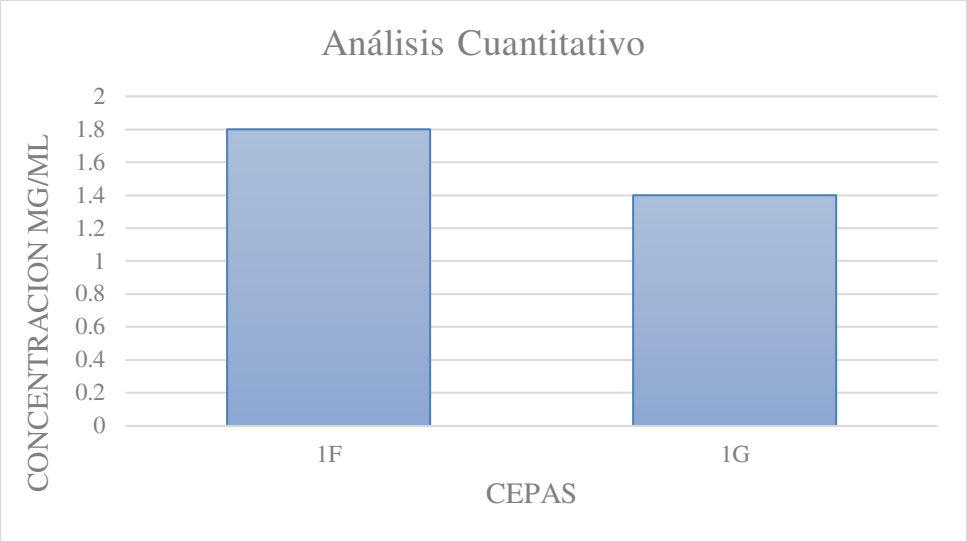


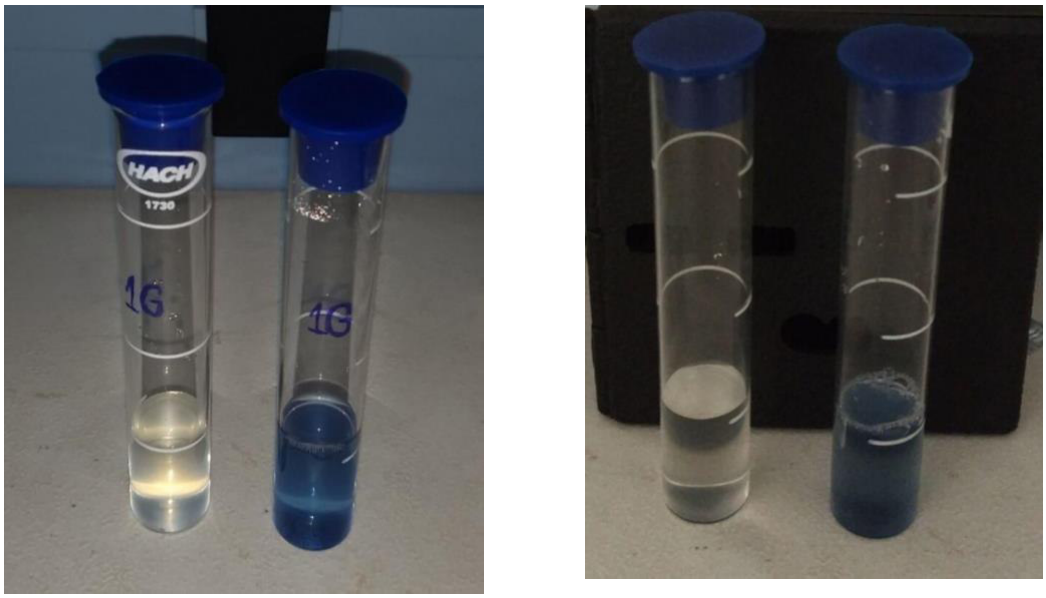
Figura 19. Prueba de cuantificación de ortofosfato, mediciones en mgL-1



Una vez realizadas las mediciones en placa, se seleccionó las mejores cepas con los índices de solubilización más elevados para realizar pruebas de cuantificación de ortofosfatos con el kit de reacción rápida HACH PO-19.

Figura 20. Prueba de cuantificación de ortofosfato con el kit HACH

A **B**



4.3 Optimización de las variables en el proceso de producción de biomasa

Se obtuvo las cinéticas de crecimiento de la cepa 1F con los siguientes parámetros de pH, RPM, y T°.

Figura 21. Cinética de crecimiento de la cepa 1F con parámetros de 120 RPM, pH 7, 28ºC. 1VVM

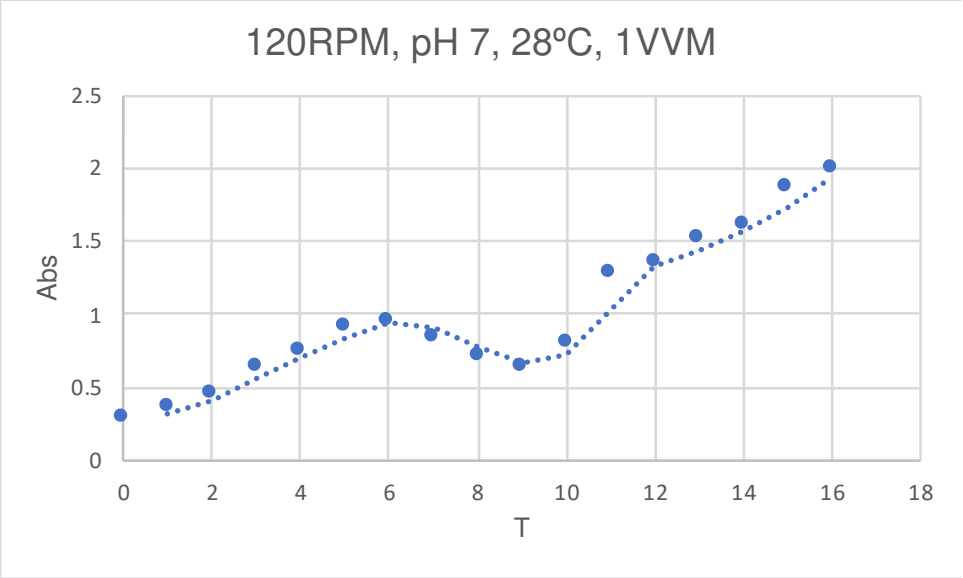


Figura 22. Línea de tendencia polinómica de grado 2, cinética 2

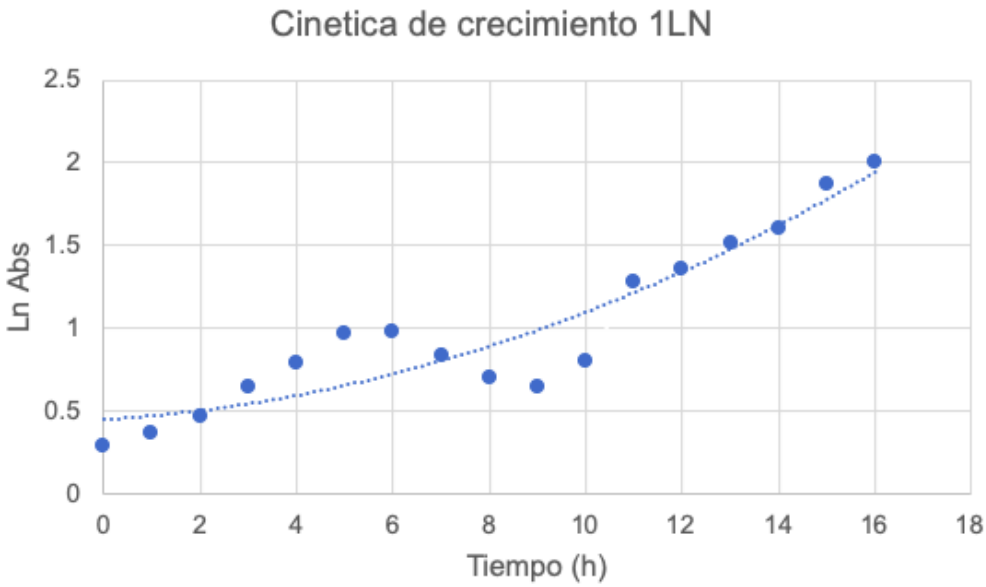


Figura 23. Cinética de crecimiento 2 de la cepa 1F con parámetros 120 RPM, de pH 7, 30 ºC, 1VVM

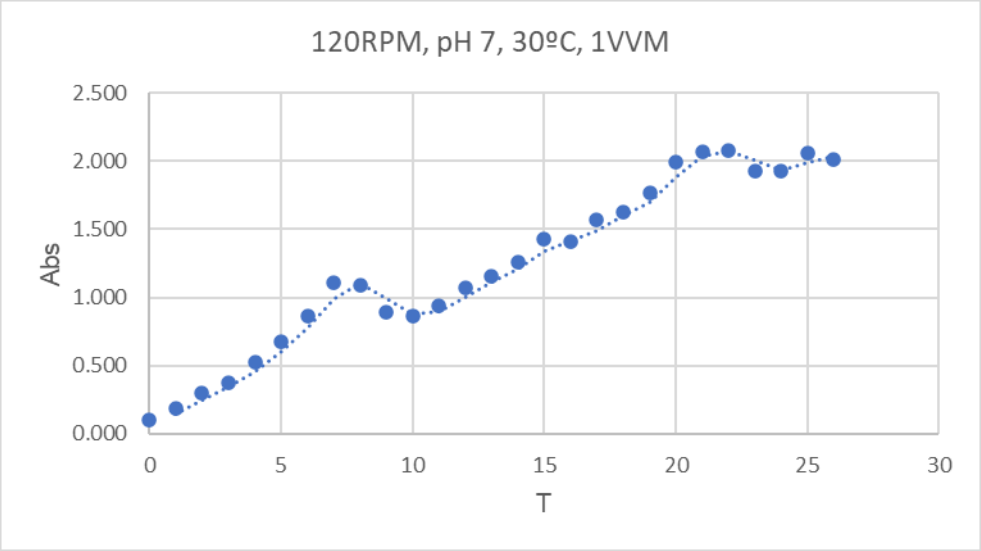


Figura 24. Línea de tendencia polinómica de grado 2, cinetica 2

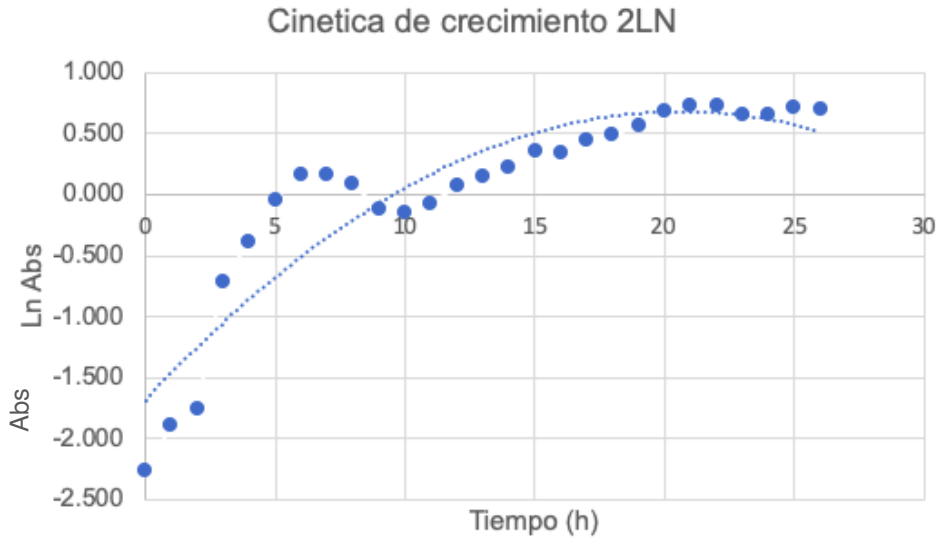
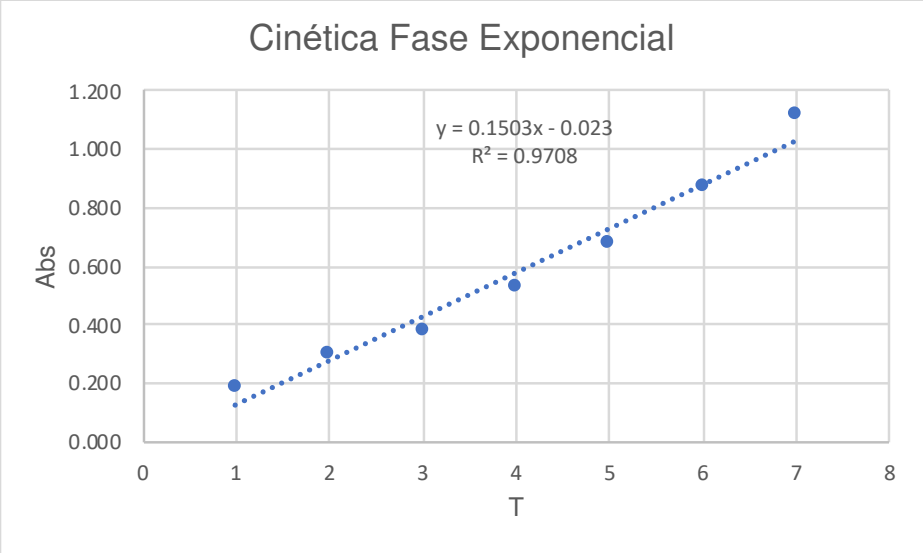


Figura 25. Cinética Fase Exponencial.
Cepa 1F con parametros 120RPM, pH7, 30ºC, 1VVM.



V. DISCUSIÓN

Las muestras recolectadas fueron aisladas a través de medio de enriquecimiento Winogradsky y posteriormente sembradas en placas por agotamiento por estrías en placas con medio selectivo Ashby, encontrándose entre ella diferencias morfológicas y de tamaño, de manera similar a lo hallado por Upadhyay S et al. (2015)[88] quienes utilizaron el medio de Jensen. Escobar C et al. (2011)[21] utilizaron como medio selectivo caldo Ahsby y sus resultados coinciden con los obtenidos en este estudio. Clavijo C et al. (2012)[89] emplearon medio mínimo sin nitrógeno con resultados similares a los obtenidos aquí, lo que evidencia que existen varios medios que funcionan muy bien para el aislamiento de microorganismos diazotroficos.

Las pruebas bioquímicas se llevaron a cabo de acuerdo al manual de Bergey a fin de establecer que colonias aisladas eran presuntivas del género *Azotobacter sp*. las cuales consideramos suficientes para efectos del estudio, a diferencia de Borda-Molina D et al. (2009)[78]. quienes profundizan aún más la caracterización bioquímica, llevando a cabo análisis de restricción molecular y comparándolo con secuencias de bacterias fijadoras de nitrógeno que brinda mayor certeza de la identificación.

La evaluación de la capacidad fijadora de nitrógeno de los microorganismos aislados se realizó utilizando medio libre de nitrógeno (medio de Burk), para posteriormente cuantificar el ion amonio producido mediante el método colorimétrico de Berthelot.

De los 24 microorganismos analizados se detectaron 5 con un alto potencial de fijación de nitrógeno, con un valor máximo de 2.0496 mg/L de amonio, resultado superior al hallado por Lara C et al. (2021) [83], de 0.258 mg/L de amonio cuando se cultivan en medio de Burk.

Los resultados obtenidos confirmaron que los microorganismos analizados tenían una alta probabilidad de actuar como biofertilizante.

Según Pollman S et al. (2009) [90] el triptófano es el precursor en la síntesis del ácido indolacético, el cual se considera un indicador para evaluar la capacidad de los microorganismos de producir fitohormonas, es por ello que se añadió triptófano al medio de burk para después medir la cantidad de ácido indolacético producido mediante un método colorimétrico con ayuda del reactivo de Salkowski, el cual oxida los compuestos indólicos producidos, desarrollando un color rosa cuya intensidad es directamente proporcional a la concentración de ácido indolacético presente tal como lo refiere Grunennvaldt R et al. (2018)[91]. De esa forma se obtuvieron valores de entre 15.013 - 57.829 mL/L de ácido indolacético por cada uno de los microorganismos testeados.

Estos valores son similares a los obtenidos por Lara C et al (2021)[83] 2.42 - 46.47 mg/L; Clavijo C et al. (2012)[89] 7.10 - 57.99 mg/L y Escobar C et al (2011)[21], 3.164 - 44.276 mg/L.

La capacidad para solubilizar fosfatos es otra característica que los microorganismos biofertilizantes poseen y está basado en la capacidad liberar ácidos orgánicos al medio, tales como el ácido glucónico y ácido 2-cetoglutarico, cítrico, etc como lo indican Elhaissoufi W et al. (2021)[92]. Esta característica se evaluó en medios conteniendo sales de fosfato , mediante la observación de formación de halos translúcidos alrededor de las colonias, indicativo de la solubilidad de dichos fosfatos, y para evaluar esta capacidad solubilizadora de fosfatos de manera comparativa entre uno y otro microorganismo fue preciso establecer un convencionalismo de Índice de Solubilidad (IS), tal como lo sugieren Becerra J et al. (2011)[93] y de esa forma se determinaron aquellos microorganismos con mayor capacidad para solubilizar fosfatos respecto a otros.

Respecto a las temperaturas evaluadas, en el estudio se observó que una variación de temperatura de entre 28 – 30°C influye dramáticamente en el aumento de la velocidad de crecimiento, lo que concuerda con lo indicado por Gómez G et al. (2006) [94] dónde variaciones mínimas de temperatura impactan en la velocidad de crecimiento. De esta evaluación en el estudio se observó que a una temperatura de 30°C la velocidad de crecimiento es superior que a 28ºC, este resultado se condice con lo señalado en estudios similares llevados a cabo Damir O et al. (2011)[39] dónde se indica que la especie *A. chroococcum* crece mejor a temperaturas en el rango de

28 – 32°C, este dato es corroborado por Dhanasekar R et al. (2003)[95] quienes señalan la temperatura de 30ºC como la ideal para el cultivo de *Azotobacter sp*.

En cuanto al pH Mukhtar H et al. (2018)[71] señalan el pH 7 como el óptimo para el crecimiento de *Azotobacter sp* y para contrastar este dato se trabajó también a pH 6, observándose un decrecimiento de la velocidad de crecimiento respecto al pH 7; aquí se evidenció, como lo señalan otros estudios, que a pH neutro *Azotobacter sp* crece mucho mejor a pesar de que otros estudios indican valores de pH más amplios de entre 7 y 7.5 [30].

La velocidad agitación es una variable que no se suele medir debido a que la mayoría de estudios se llevan a cabo en matraces agitados. Galal G et al. (2014)[96] señalan que, durante el cultivo de *Azotobacter chroococum*, a mayor velocidad de agitación se obtiene mayor biomasa. En nuestro caso, el biorreactor nos permitió controlar la velocidad de agitación, lo que puso en evidencia que a 120RPM la velocidad de crecimiento es superior que a 80RPM. Es lógico pensar que a mayor velocidad de agitación mayor producción de biomasa, tal como lo señalan otros autores como Camelo- Rusinque M et al. (2017)[97] y Peña C et al. (2000)[98] que concuerdan en el mismo sentido.

Los resultados aquí obtenidos nos indican dos cosas: La primera que los resultados de la caracterización de los microorganismos nos señalan que estos son presuntivos para el género *Azotobacter sp* y la segunda que las condiciones de cultivo evaluadas son las mejores para la obtención de mayor contenido de biomasa; así mismo es necesario precisar, que con estos resultados, no podemos afirmar de manera fehaciente que estamos frente a una cepa de *Azotobacter sp* con capacidad de actuar como biofertilizante, para ello se deberían llevar a cabo pruebas de campo que corroboren lo anterior, pues como se menciona en los antecedentes existen varias variables que afectan su performance como biofertilizante y que se deben evaluar, como: su preservación, estabilidad, formulación, aplicación, etc.

VI. CONCLUSIONES

1. Las muestras de tierra tomadas, cercanas al suelo rizosférico, tuvieron una carga apreciable de microorganismos diazotroficos, corroborando lo que indica la literatura al respecto.
2. Mediante el medio selectivo Ashby se lograron aislar 25 cepas con capacidades diazotroficas, de ellas 18 fueron presuntivas para el género *Azotobacter sp* de acuerdo a la evaluación morfológica y caracterización bioquímica.
3. La cepa identificada como 1F fue la que presentó la mejor capacidad diazotrofica. Logró fijar nitrógeno con un valor de 2.7547 mgL^{-1} como NH_3, las pruebas comparativas de solubilización de fosfato en Agar Sundara-Rao indicaron que la cepa 1F presentó la mayor capacidad para solubilizar fosfatos de acuerdo a la medición de los halos de solubilización y en cuanto a la producción de fitohormonas también presentó la mayor producción en términos de ácido indolacetico 54.972 mgL^{-1}
4. Las corridas en el biorreactor BiostatA mostraron que una temperatura de 30ºC, agitación de 120RPM y pH 7 son los valores más propicios para lograr la mayor producción de biomasa de la cepa 1F, esto fue corroborado a través de los análisis estadísticos de diseño factorial y superficie de respuesta.

VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Tejera N, Lluch C, Martínez-Toledo MV, González-López J. Isolation and characterization of Azotobacter and Azospirillum strains from the sugarcane rhizosphere. Plant and Soil. 2005; 1(270): p. 223 - 232.
2. Aguado G. Introducción al Uso y Manejo de los Biofertilizantes en la Agricultura. 1st ed. Pecuarias INdIFAy, editor. Guanajuato: Circe - Inifap; 2012.
3. Niladri P, Utpal G, Courab R. Composting. En Soloneski MLaS, editor. Organic Fertilizers. History, Production and Applications. London: IntechOpen; 2019. p. 43 - 58.
4. Hamzaoui-Essoussi L, Zahaf M. The Organic Food Market: Opportunities and Challenges. En Reed M, editor. Organic Food and Agriculture - New Trends and Developments in the Social Sciences. Rijeka: IntechOpen; 2012. p. 63 - 84.
5. Sethi S, Ashikary S. Cost effective pilot scale production of biofertilizer. African Journal of Biotechnology. 2012; 11(70).
6. Dibut B, Martínez-Viera R, Ortega M, Ríos Y, Tejeda G, Planas L, et al. Situación Actual y Perspectiva de las Relaciones Endofitas Planta-Bacteriua. Estudio de caso Gluconoibacter diazotrophicus - Cultivos de Importancia Económica. Cultivos Tropicales. 2009; 30(4): p. 16 - 23.
7. Asif M, Mughal A, Bisma R, Mehdi Z, Saima S, Ajaz M, et al. Application of Different Strains of Biofertilizers for Raising. International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences. 2018; 7(10): p. 3681 - 3684.
8. Mushtaq Z, Faizan S, Hussain A. Role of Microorganisms as Biofertilizers. En al KRHe, editor. Microbiota and Biofertilizers. Switzerland: Springer; 2021. p. 83 - 98.
9. Kizilkaya R. Nitrogen fixation capacity of Azotobacter sp. strains isolated from soils in different ecosystems and relationship between them and the microbiological properties of soils. Journal of Environmental Biology. 2009; 30(1).
10. Carvajal-Muñoz J, Carmona-García C. Benefits and limitations of biofertilization in agricultural practices. Livestock Research for Rural Development. 2012; 24(3): p. 1 - 8.

11. Malusa E, Pinzari F, Canfora L. Microbial Inoculants in Sustainable Agricultural Productivity. En al DPSe, editor. Efficacy of Biofertilizers: Challenges to Improve Crop Production. Skierniewice: Springer; 2016. p. 17 - 32.
12. Bashan Y, de-Bashan L. Inoculant Preparation and Formulations for Azospirillum spp. En al Ce, editor. Handbook for Azospirillum. Switzerland: Springer; 2015. p. 469 - 486.
13. Revillas J, Rodelas B, Pozo C, Martínez-Toledo M, Gonzáles-López J. Production of amino acids by Azotobacter vinelandii an Azotobacter Chroococcum with phenolic compounds as sole carbon source under diazotrophic conditions. Aminio Acids. 2005; 28.
14. Mus F, Crook M, García K, García-Costas A, Geddes B, Kouri E, et al. Symbiotic Nitrogen Fixation and the Challenges to Its Extension to Nonlegumes. American Society for Microbiology. 2016; 82(13).
15. Wagner S. Biological Nitrogen Fixation. The Nature Education Knowledge. 2011; 3(10).
16. Mahdi S, Hassan G, Samoon S, Rather H, Dar S, Zehra B. Bio-Fertilizer in Organic Agriculture. Journal of Phytology. 2010; 2(10).
17. Gamaruddin , Tahir A, Anita A, Asri B. The Impact of Azotoibacter Chroococcum and Liquid Organic Fertilizer on Nutrients, Nitrogen and Phosphate. International Journal of Science & Technology Research. 2019; 8(8).
18. Alizadeh O, Ordookhani K. Use of N2-fixing Bacteria Azotobacter, Azosprilium in Optimizing of Using Nitrogen in Sustainable Wheat Cropping. Adsvances in Environmental Biology. 2011; 5(7): p. 1572 - 1574.
19. Habibi A, Heidari G, Sohrabi Y, Badakhsham H, Mohammadi K. Influence of bio, organic and chemical fertilizers on medicinal pumpkin traits. Journal of Medicinal Plants Research. 2011; 5(23): p. 5590 - 5597.
20. Din M, Nelofer R, Salman M, Abdullah , Khan F, Khan A, et al. Production of nitrogen fixing Azotobacter (SR-4) and phosphorus solubilizing Aspergillus niger and their evaluation on Lagenaria siceraria. Biotechnology Reports. 2019; 22: p. 1 - 5.

21. Escobar C, Horna Y, Carreño C, Mendoza G. Characterization of native strains of Azotobacter spp. and its effect on growth of Lycopersicon esculentum Mill. “tomato” in Lambayeque. Scientia Agropecuaria. 2011; 2: p. 39 - 49.

22. Sumbul A, Ansari R, Rizvi R, Mahmood I. Azotobacter: A potential bio-fertilizer for soil and plant health management. Saudi Journal of Biological Sciences. 2020; 27: p. 3634 - 3640.

23. Fitriatin B, Nurmala D. In vitro test for compatibility of biofertilizers containing phosphate solubilizers and nitrogen-fixing bacteria. Earth and Environmental Science. 2019; 393: p. 1 - 5.

24. Alfani Y, Suryatmana P, Setiawan D. The effect of Additive Combination and Azotobacter sp. towards Glycine max, L. Growth. Jurnal Penelitian Saintek. 2019; 24(2): p. 1 - 11.

25. Sethi S, Adhikary S. Azotobacter: A Plant Growth Promoting Rhizobacteria Used as Biofertilizer. Global Science Book. 2012; 6(1): p. 68 - 74.

26. Mahato A, Bharati V, Bhavana P, Sriniketan. Entrepreurial Training Manual, The Professor and Head Department of Microbiology Tamil. Nadu Agricultural University, Coimbatore-3.. [Online]; 2012. Acceso 14 de Decemberde 2021. Disponible en: https://moam.info/bio-fertilizers-in-organic-agriculture_5b6c85de097c4708098b4586.html.

27. Petris-Symanczik S. fibl.org. [Online].; 2020. Acceso 13 de April de 2021. Disponible en: https://www.fibl.org/fileadmin/documents/shop/1121-biofertilisers.pdf.

28. Mohammadi K, Sohrabi Y. Bacterial Biofertilizers for Sustainable Crop Production: A Review. ARPN Journal of Agricultural and Biological Science. 2012; 7(5): p. 307 - 316.

29. Quddu F. Recent Advances in Biofertilizer. University of Management and Technology. 2021;: p. 1-13.

30. Aasfar A, Bargaz A, Yaakoubi K, Hilali A, Bennis I, Zeroual Y, et al. Nitrogen Fixing Azotobacter Species as Potential Soil Biological Enhancers for Crop Nutrition and Yield Stability. Microbiol. 2021; 12: p. 1 - 19.

31. Hassan T, Bano A. Biofertilizer: A novel formulation for improving wheat growth, physiology and yield. Pak. J. Bot. 2016; 48(6): p. 2233 - 2241.

32. Gomare K, Mese M, Shetkar Y. Isolation of Rhizobium and cost effective production of biofertilizer. Indian J. L. Sci. 2013; 2(2): p. 49 - 53.

33. Satinder B, Sarma S, Chaabouni E. Shelf-life of Biofertilizers: An Accord between Formulations and Genetics. Biofertilizers & Biopesticides. 2012; 3(5): p. 1 - 2.

34. Xia J, Wang G, Lin J, Wang Y, Chu J, Zhuang Y, et al. Advances and Practices of Bioprocess Scale-up. En Bao J, Ye Q, Zhong JJ, editores. Bioreactor Engineering Research and Industrial Applications II.: Springer; 2016. p. 137 - 151.

35. Gutierrez-Rojas I, Torres-Geraldo A, Moreno-Sarmiento N. Optimising carbon and nitrogen sources for Azotobacter chroococcum growth. African Journal of Biotechnology. 2011; 10(5): p. 2951 - 2958.

36. Azam Z, Saufi N, Rosli M, Hanin K, Yeng L, Sarmidi M, et al. Nutritional Requirements of Azotobacter chroococcum for Growth and their Use as Biofertilizer. En: 2nd ICA Research SymposiumPagoh: Innovation Centre in Agritechnology for Advanced Bioprocessing (ICA); 2019 p. 22 - 27.

37. Gauri S, Mandal S, Pati B. Impact of Azotobacter exopolysaccharides on sustainable agriculture. Appl Microbiol Biotechnol. 2012; 95: p. 331 - 338.

38. Diaz-Barrera A, Soto E. Biotechnological uses of Azotobacter vinelandii: Current state, limits and prospects. African Journal of Biotechnology. 2010; 9(33): p. 5240 - 5250.

39. Damir O, Mladen P, Bozidar S, Srdan N. Cultivation of the bacterium Azotobacter chroococcum for preparation of biofertilizers. African Journal of Biotechnology. 2011; 10(16): p. 3104 - 3111.

40. Sethi S, Adhikary S. Cost effective pilot scale production of biofertilizer using Rhizobium and Azotobacter. African Journal of Biotechnology. 2012; 11(70): p. 13490 - 13493.

41. Barman M, Paul S, Choudhury A, Roy P, Sen J. Biofertilizer as Prospective Input for Sustainable Agriculture in India. International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences. 2017; 6(11): p. 1177 - 1186.

42. Lara-Mantilla C, Villalba-Anaya M, Oviedo-Zumaque L. Bacterias fijadoras asimbióticas de nitrógeno de la zona agrícola de San Carlos. Córdoba, Colombia. Revista Colombiana de Biotecnología. 2007; 9(2): p. 6 - 14.

43. Xiong Q, Hu J, Wei H, Zhang H, Zhu J. Relationship between Plant Roots, Rhizosphere Microorganisms, and Nitrogen and Its Special Focus on Rice. Agriculture. 2021; 11(3): p. 1 - 18.

44. Urgiles-Gómez N, Avila-Salem M, Loján P, Encalada M, Hurtado L, Araujo S, et al. Plant Growth-Promoting Microorganisms in Coffee Production: From Isolation to Field Application. Agronomy. 2021; 11: p. 1 - 12.

45. Kilian M, Steiner U, Krebs B, Junge H, Schniedeknecht G, Hain R. FZB24® Bacillus subtilis – mode of action of a microbial agent enhancing plant vitality. Pflanzenschutz-Nachrichten Bayer. 2001;: p. 72 - 93.

46. Huang XF, Chaparro J, Reardon K, Zhang R, Shen Q, Vivanco J. Rhizosphere interactions: root exudates, microbes, and microbial communities. NRC Research Press. 2014.

47. Mendes R, Garbeva P, Raaijmakers J. The rhizosphere microbiome: significance of plant beneficial, plant pathogenic, and human pathogenic microorganisms. FEMS Microbiology Reviews. 2013; 37(5): p. 634 - 663.

48. Bai YC, Chang YY, Hussain M, Lu B, Zhang JP, Song XB, et al. Soil Chemical and Microbiological Properties Are Changed by Long-Term Chemical Fertilizers That Limit Ecosystem Functioning. Microorganisms. 2020; 8(5).

49. Kumar R, Kumawat N, Sahu Y. Role of Biofertilizers in Agriculture. Popular Kheti. 2017; 5(4): p. 63 - 66.

50. Jha C, Sarat M. Plant growth promoting Rhizobacteria (PGPR): A Review. Journal of Agricultural Research and Development. 2015; 5(2): p. 108 - 119.

51. Mahanty T, Bhattacharje S, Goswami M, Bhattacharyya P, Das B, Ghosh A, et al. Biofertilizers: a potential approach for sustainable agriculture development. nviron Sci Pollut Res. 2016; 24: p. 3315–3335.

52. Gothwal R, Nigam V, Mohan M, Sasmal D, Ghosh P. Screening of nitrogen fixers from rhozospheric bacterial isolates associated with important desert plants. Applied Ecology and Environmental Research. 2008; 6(2): p. 101 - 109.

53. Fasusi O, Cruz C, Babalola O. Agricultural Sustainability: Microbial Biofertilizers in Rhizosphere Management. Agriculture. 2021; 11(2): p. 1 - 19.

54. Nosheen S, Ajmal I, Song Y. Microbes as Biofertilizers, a Potential Approach for Sustainable Crop Production. Sustainability. 2021; 13(4): p. 1 - 20.

55. Verma D, Kaur B, Pandey A, Asthir B. Nitrogenase: A key enzyme in microbiual nitrogen fixation for soil health. En Verma DK. Microbiology for Sustainable Agriculture, Soil Health, and Environmental Protection. Bengal: Apple Academic Press; 2019. p. 261 - 293.

56. Einsle O, Rees D. Structural Enzymology of Nitrogenase Enzymes. Chemical Review. 2020; 120(12): p. 4969–5004.

57. Lovell T, Li J, Liu T, Case D, Noodleman L. FeMo cofactor of nitrogenase: a density functional study of states M(N), M(OX), M(R), and M(I). Journal American Chemical Society. 2001; 123(49): p. 12392–12410.

58. Tan K, Radziah O, Halimi M, Khairuddin A, Shamsuddin Z. Assessment of plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR) and rhizobia as multi-strain biofertilizer on growth and N2 fixation of rice plant. Australian Journal of Crop Science. 2015; 9(12): p. 1257 - 1264.

59. Glick B. Plant Growth-Promoting Bacteria: Mechanisms and Applications. Scientica. 2012;: p. 1 - 15.

60. Gupta A. Phosphate solubilizing Microorganisms: Fungi and Bacteria. En Services NPC, editor. The Complete Technology Book on Biofertilizer and Organic Farming -2nd Revised Edition.: Asia Pacific; 2012. p. 129 - 144.

61. Patiño-Torres C, Sanclemente-Reyes O. redalyc. [Online]; 2014. Acceso 14 de Diciembrede 2021. Disponible en: https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=265433711018.

62. Zeitoun R, Biswas A. Review—Potentiometric Determination of Phosphate Using Cobalt: A Review. Journal of The Electrochemical Society. 2020; 167(12).

63. Hider R, Kong X. Chemistry and Biology of Siderophores. Journal: Natural Product Reports. 2010; 27(5): p. 637 - 657.

64. Zhang BX, Li PS, Wang YY, Wang JJ, Liu XL, Wang XY, et al. Characterization and synthesis of indole-3-acetic acid in plant growth promoting Enterobacter sp. Royalk Society of Chemistry. 2021; 11: p. 31601 - 31607.

65. Spaepen S, Vanderleyden J. Auxin and Plant-Microbe Interactions. Cold Spring Harb Perspect Biololy. 2011; 3(4): p. 1 - 13.

66. Vega-Celedon P, Canchignia H, González M, Seeger M. Biosynthesis of indol-3-acetic acid and plant growth promoting by bacteria. Cultivos Tropicales. 2016; 37: p. 31 - 37.

67. Seenivasagan R, Babalola O. Utilization of Microbial Consortia as Biofertilizers and Biopesticides for the Production of Feasible Agricultural Product. Biology. 2021; 10(11).

68. Peng S, Biswas J, Ladha J, Gyaneshwar P, Chen Y. Influence of Rhizobial inoculation on photosynthesis and grain yield of rice. Agronomy Journal. 2002; 94(4): p. 925 - 929.

69. Dimkpa C, Merten D, Svatos A, Buchel G, Kothe E. Metal-induced oxidative stress impacting plant growth in contaminated soil is alleviated by microbial siderophores. Soil Biology & Biochemistry. 2008; 41(1): p. 154 - 162.

70. Ojha R, Marahatta M, Jnawali A. Role of Azotobacter in Soil Fertility and Sustainability–A Review. Advances in Plants & Agriculture Research. 2015; 2(6).

71. Mukthar H, Bashir H, Nawaz A, Haq I. Optimization of growth conditions for Azotobacter species and their use as biofertilizer. Journal of Bacteriology & Mycology: Open Access. 2018; 6(5): p. 274 - 278.

72. Wang L, Fan D, Chen W, Terentjev E. Bacterial growth, detachment and cell size control on polyethylene terephthalate surfaces. Scientific Reports. 2015; 5(10): p. 1 - 9.

73. Yang Y, Sha M. A Beginner's Guide to Bioprocess Modes – Batch, Fed-Batch, and Continuous Fermentation. Eppendorf Application Note Nº 408. 2019;: p. 1 -16.

74. Crater J, Lievense J. Scale-up of industrial microbial processes. FEMS Microbiology Letters. 2018; 365(13).

75. García-Ochoa F, Gomez E. Bioreactor scale-up and oxygen transfer rate in microbial processes: An overview. Biotechnology Advances. 2009; 27(2): p. 153 - 176.

76. Quiroga-Cubides G, Díaz A, Gómez M. Adjustment and Scale-Up Strategy of Pilot Liquid Fermentation Process of Azotobacter sp. International Journal of Biological, Biomolecular, Agricultural, Food and Biotechnological Engineering. 2017; 11(4).

77. Trujillo-Roldan M, Valdez-Cruz N, Gonzalez-Monterrubio C, Acevedo-Sánchez E, Marínez-Salinas C, García-Cabrera R, et al. Scale-up from shake flasks to pilot-scale production of the plant growth-promoting production of the plant growth-promoting a liquid inoculant formulation. Applied Microbiology Biotechnology. 2013; 97(22): p. 9665–9674.

78. Borda-Molina D, Pardo-García J, Martínez-Salgado M, Montaña-Lara J. Producción de un biofertilizante a partir de un aislamiento de Azotobacter nigricans obtenido en un cultivo de Stevia rebaudiana Bert. UNIVERSITAS SCIENTIARUM. 2009; 14(10): p. 1 - 8.

79. Jiménez-Avella D. Caracterización Molecular de cepas nativas colombianas de Azotoibacter spp. mediante el análisis de restricción del adn ribosomal 16S. Tesis. Bogota: Pontificia Universidad Javeriana, Facultad de Ciencias Básicas.

80. Jaramillo Calle L. Aislamiento y selección de rizobacterias del género Azotobacter y Bacillus con potencial aplicación como bioinoculante en el cultivo de Mangifera indica L (mango). Tesis. Lima: Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Facultad de Ciencias Biológicas.

81. Acosta-Ovalles A. Evaluación de técnicas de conservación para microorganismos de importancia en microbiología industrial en el Cepario de la Universidad de Santander. Tesis. Bucaramanga: Universidad de Santander UDES, Facultad de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales.

82. Manual B. Bergey´s manual of Systematic Bacteriology. 2nd ed. Garrity G, editor. Michigan: Springer; 2005.

83. Lara C, Villalba M, Oviedo L. redalyc. [Online].; 2007. Acceso 14 de Diciembre de 2021. Disponible en: https://www.redalyc.org/comocitar.oa?id=77690202.

84. Ishak F, Rahim A, Mean L, Ayub N, Fazilah N. Preliminary analysis of Endophytic Plant Growth Promoting (PGP) Methylobacterium sp. Isolated from Palm Oil (Elaeisguineensis) Leaves. IOP Conf. Series: Earth and Environmental Science. 2021; 765.

85. Qarni A, Billah M, Hussain K, Shah S, Ahmed W, Alam S, et al. Isolation and Characterization of Phosphate Solubilizing Microbes from Rock Phosphate Mines and Their Potential Effect for Sustainable Agriculture. Sustainability. 2021; 13(4): p. 1 - 14.

86. Jiménes Flores V. Optimización de un Medio de Cultivo para Bacterias Solubilizadoras de Fósforo. Tesis. Coahuila: Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro, Departamento de Botánica.

87. León L, Rojas L. Determinación del potencial promotor del crecimiento vegetal de Azotobacter spp. aislados de la rizósfera de malezas en cultivos de maíz (Zea mays L.). Scientia Agropecuaria. 2015; 6(4): p. 247 - 257.

88. Upadhyay S, Kumar N, Singh V, Singh A. Isolation, characterization and morphological study of Azotobacter isolates. Journal of Applied and Natural Science. 2015; 7(2): p. 984– 990.

89. Clavijo C, Chipana V, Centeno J, Zuñiga D, Guillén C. Isolation, characterization and identification of diazotrophic bacteria in the rhizosphere of Olea europea "OLIVE" crop in Tacna Perú. Ecología Aplicada. 2012; 11(2): p. 89 - 102.

90. Pollman S, Dutching P, Weiler E. Tryptophan-dependent indole-3-acetic acid biosynthesis by 'IAA-synthase' proceeds via indole-3-acetamide. Phytochemistry. 2009; 70(4): p. 523-531.

91. Grunennvaldt R, Degenhardt-Goldbach J, Cassia J, Davila G, Aparecida V, Deschamps C. Bacillus megaterium: an endophytic bacteria from callus of Ilex paraguariensis with growth promotion activities. Biotecnología Vegetal. 2018; 18(1): p. 3 - 13.

92. Elhaissoufi W, Ghoulam G, Barakat A, Zeroual Y, Bargaz A. Phosphate bacterial solubilization: A key rhizosphere driving force enabling higher P use efficiency and crop productivity. International journal of advanced research. 2021; 38: p. 13 - 28.

93. Becerra J, Quintero D, Martínez M, Matiz A. Characterization of phosphate solubilizing microorganisms solated from soils planted with cape gooseberry (Physalis peruviana L.). Revista Colombiana de Ciencias Hortícolas. 2011; 5(2): p. 195 - 208.

94. Gómez G, Batista C. OPTIMIZACIÓN DE MEDIOS DE CULTIVOS PARA MICROORGANISMOS, UNA VALIOSA ESTRATEGIA PARA LA PRODUCCIÓN DE BIOPREPARADOS DE INTERÉS AGRÍCOLA. Cultivos Tropicales. 2006; 27(3): p. 17 - 24.

95. Dhanasekar R, Viruthagiri T, Sabarathinam P. Poly(3-hydroxy butyrate) synthesis from a mutant strain Azotobacter vinelandii utilizing glucose in a batch reactor. Biochemical Engineering Journal. 2003; 16(1): p. 1 - 8.

96. Galal G, Ouda S. Production of Alginate by Different Isolates of Azotobacter species. Life Science Journal. 2014; 11(9): p. 29 - 38.

97. Camelo-Rusinque M, Moreno-Galván A, Romero-Perdomo F, Bonilla-Buitrago R. Desarrollo de un sistema de fermentación líquida y de enquistamiento para una bacteria fijadora de nitrógeno con potencial como biofertilizante. Revista Argentina de Microbiología. 2017; 49(3): p. 289 - 296.

98. Peña C, Truhillo-Roldán M, Galindo E. Influence of dissolved oxygen tension and agitation speed on alginate production and its molecular weight in cultures of Azotobacter vinelandii. Enzyme and Microbial Technology. 2000; 27: p. 390 - 398.

VIII. ANEXOS



Figura 26. Operacionalización de los parámetros para la cinética de crecimiento de la cepa 1F

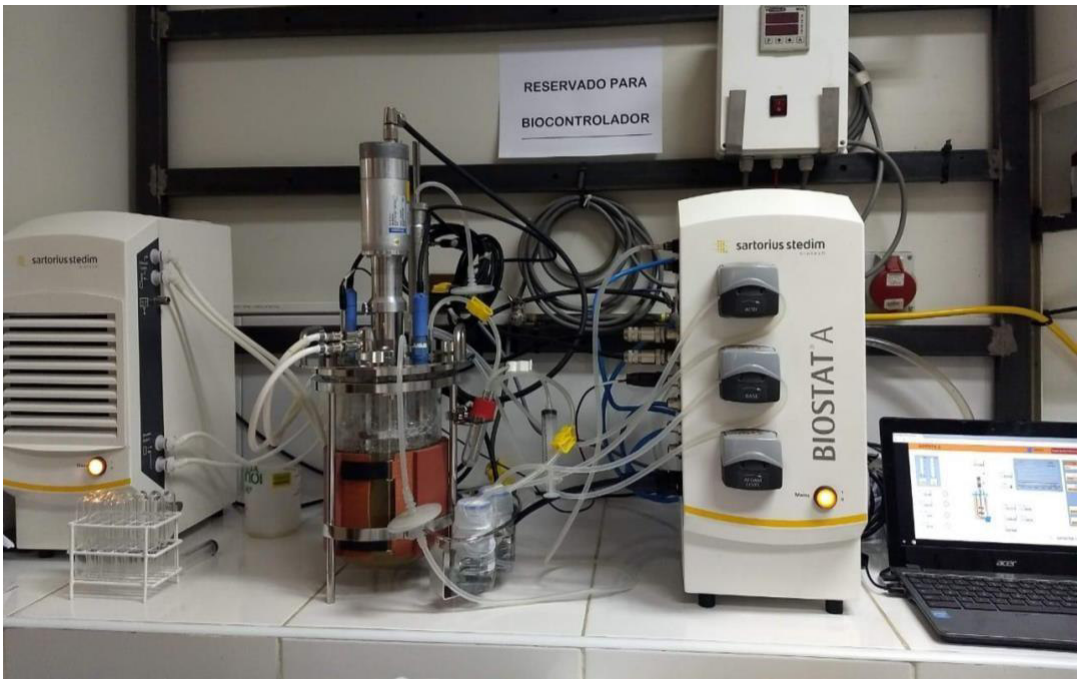


Figura 27. Bioreactor Sartorius BioStat A

Figura 28. Curva patrón de la cepa 1F. R2=0.9645

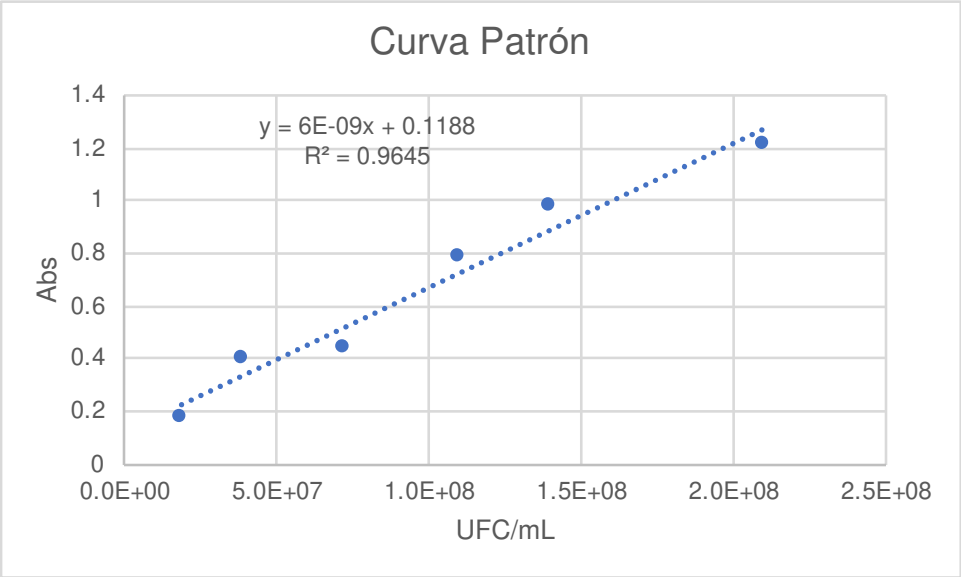
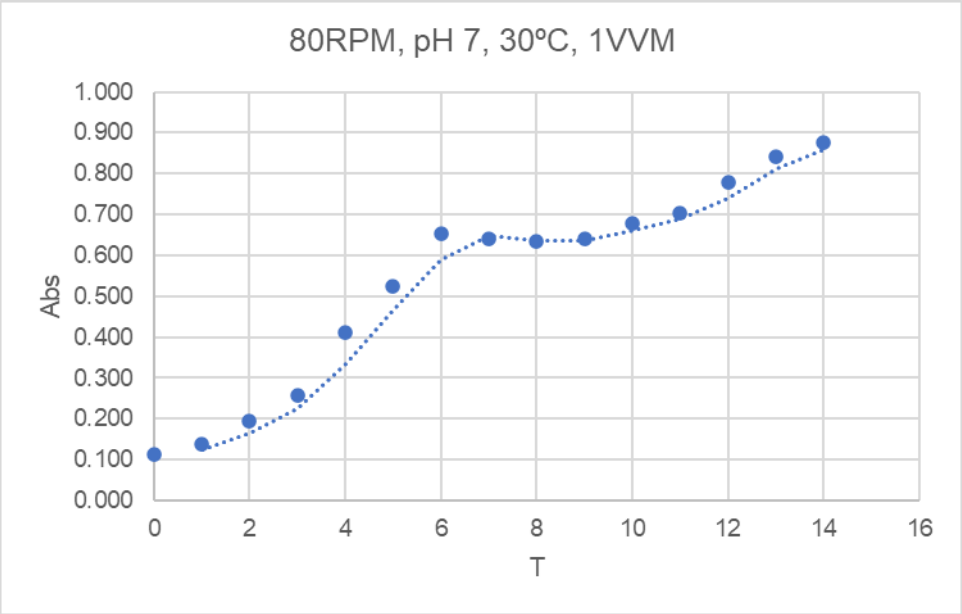
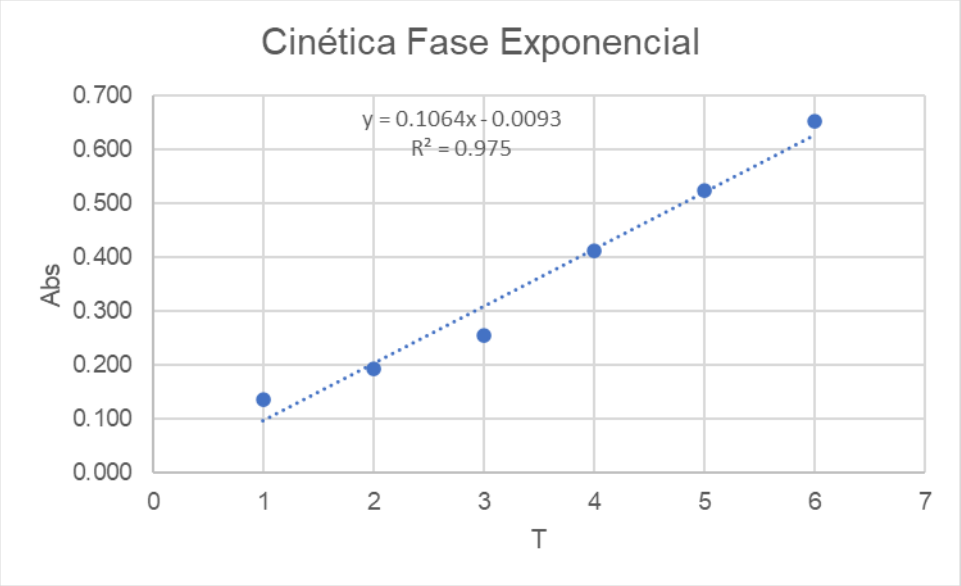


Tabla 13. Absorbancias medidas de la cinética de crecimiento. Cepa 1F con parámetros 80 RPM, pH 7.0, 30°C, 1 VVM

Tiempo	**Absorbancia**			**Abs X**
0	0.117	0.112	0.113	0.114
1	0.134	0.139	0.138	0.137
2	0.192	0.198	0.195	0.195
3	0.256	0.255	0.260	0.257
4	0.411	0.412	0.413	0.412
5	0.524	0.524	0.523	0.524
6	0.656	0.652	0.654	0.654
7	0.638	0.644	0.641	0.641
8	0.631	0.633	0.635	0.633
9	0.642	0.641	0.643	0.642
10	0.679	0.676	0.679	0.678
11	0.703	0.702	0.701	0.702
12	0.778	0.781	0.778	0.779
13	0.840	0.844	0.845	0.843
14	0.883	0.873	0.875	0.877

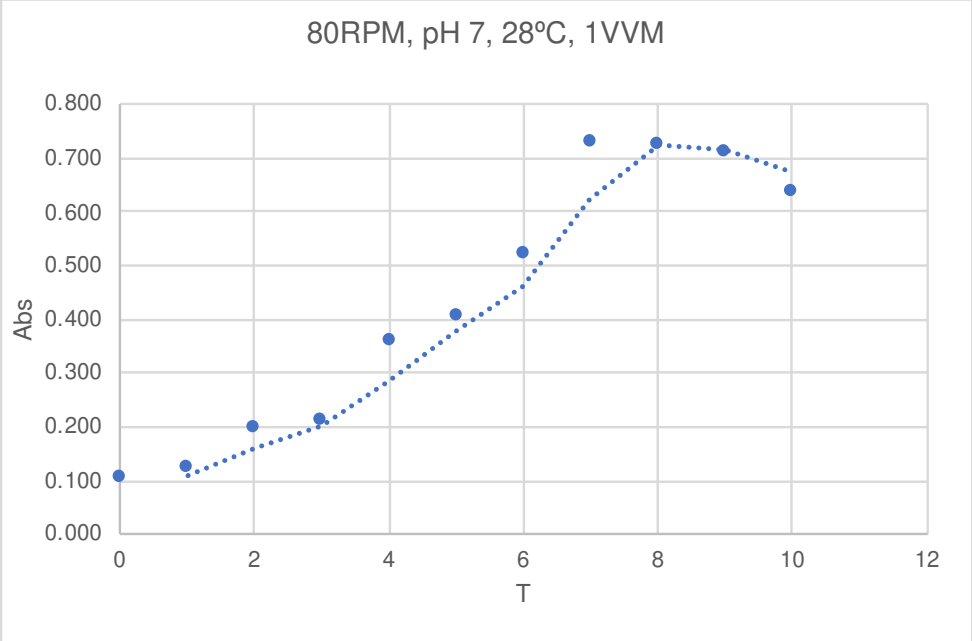


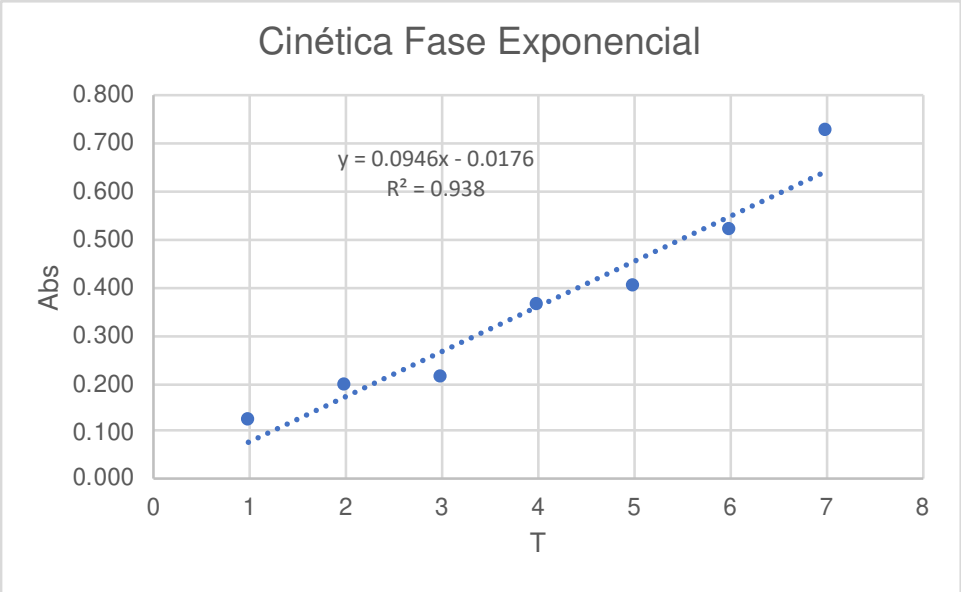


$X_f = \mu Max * \Delta t + X_0$	y = 0.1064x – 0.0093; **µMax = 0.1064 h^{-1}**

Tabla 14. Absorbancias medidas de la cinética de crecimiento.
Cepa 1F con parámetros 80 RPM, pH 7.0, 28°C, 1 VVM

Tiempo	Absorbancias			Abs X
0	0.102	0.098	0.103	0.101
1	0.120	0.123	0.123	0.122
2	0.192	0.195	0.196	0.194
3	0.207	0.205	0.208	0.207
4	0.360	0.359	0.358	0.359
5	0.398	0.403	0.402	0.401
6	0.515	0.517	0.519	0.517
7	0.729	0.725	0.724	0.725
8	0.713	0.726	0.724	0.721
9	0.713	0.711	0.709	0.711
10	0.634	0.634	0.637	0.635

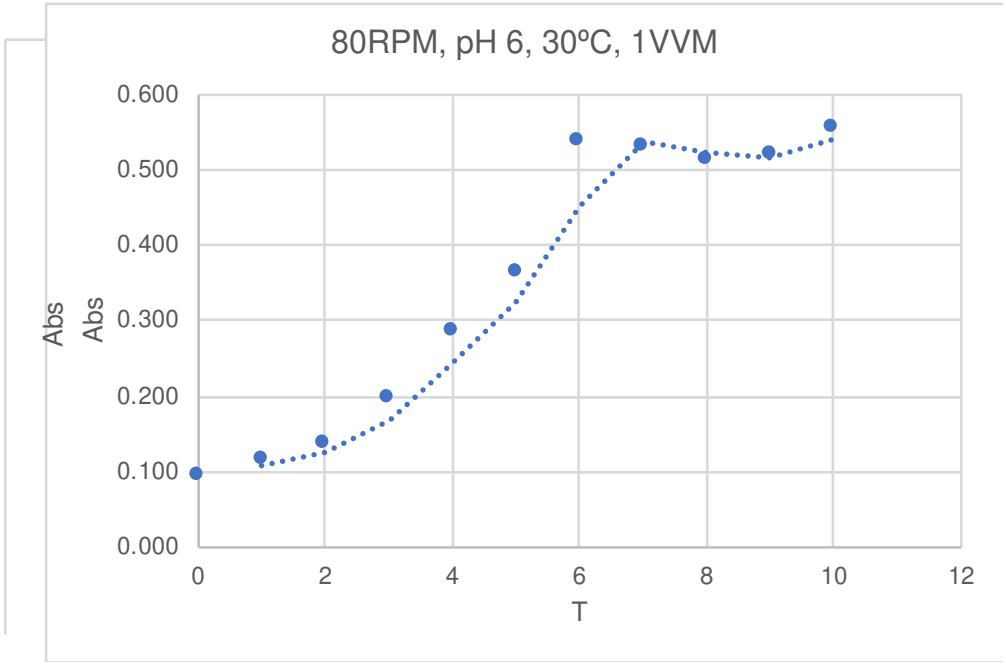


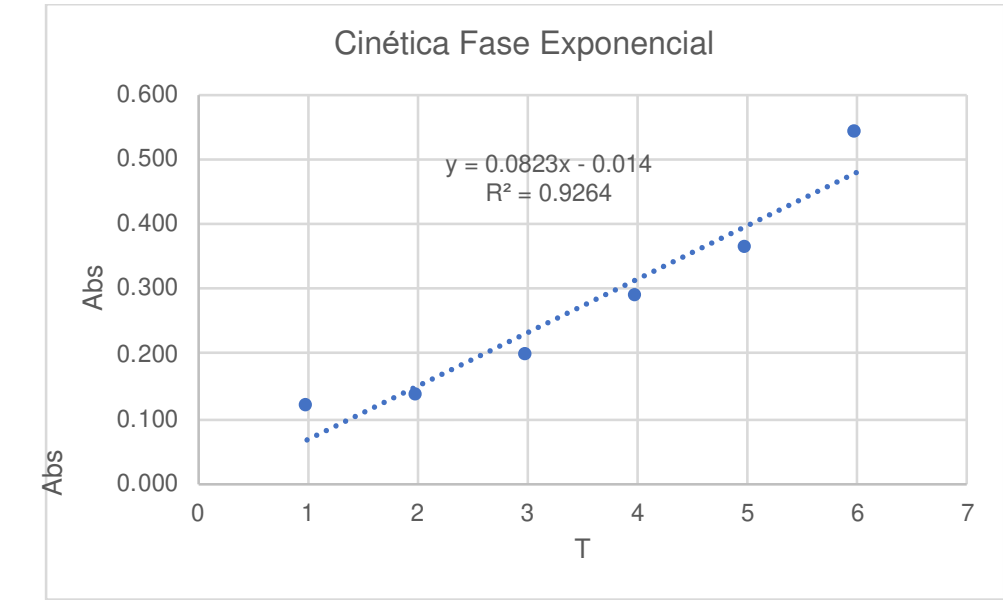


$X_f = \mu Max * \Delta t + X_0$	y = 0.0946x – 0.0176; **µMax = 0.0946 h^{-1}**

Tabla 15. Absorbancias medidas de la cinética de crecimiento.
Cepa 1F con parámetros 80 RPM, pH 6.0, 30°C, 1 VVM

Tiempo	Absorbancias			Abs X
0	0.096	0.097	0.098	0.097
1	0.119	0.117	0.118	0.118
2	0.137	0.138	0.136	0.137
3	0.199	0.196	0.199	0.198
4	0.411	0.286	0.288	0.287
5	0.287	0.524	0.523	0.364
6	0.537	0.541	0.542	0.540
7	0.530	0.534	0.535	0.533
8	0.514	0.512	0.510	0.512
9	0.520	0.522	0.524	0.522
10	0.554	0.556	0.558	0.556

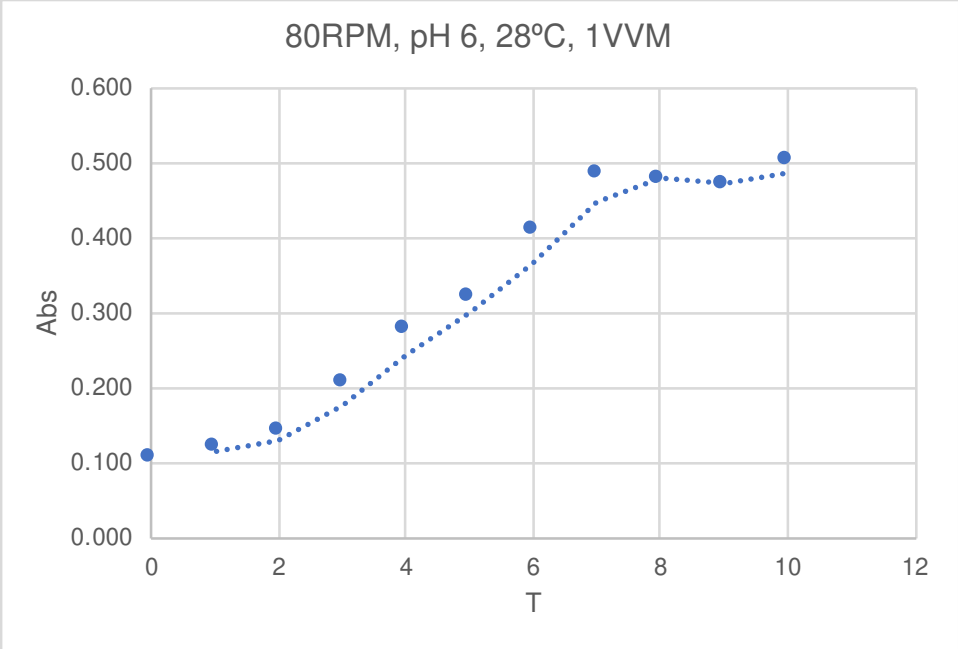


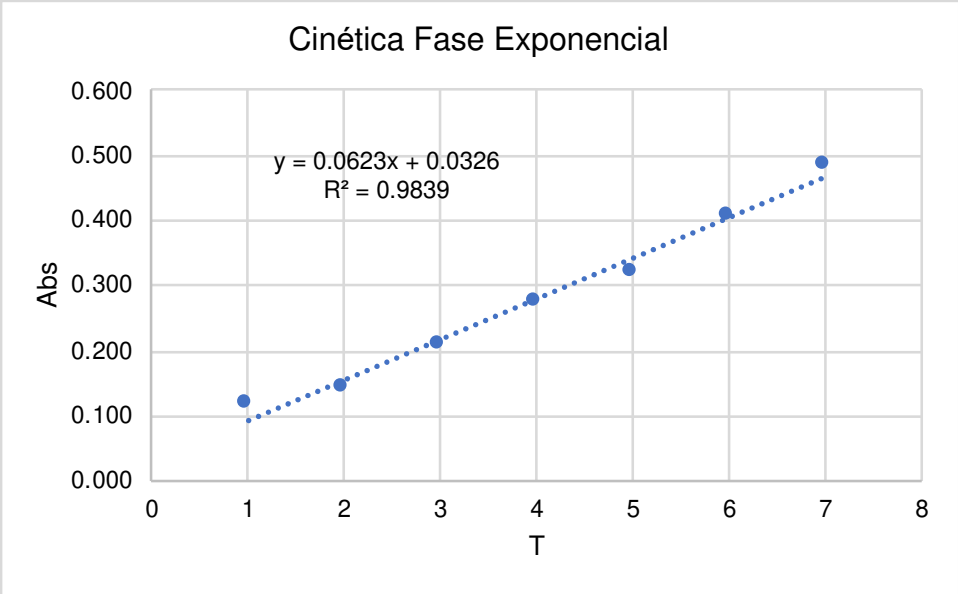


$X_f = \mu Max * \Delta t + X_0$	y = 0.0823x – 0.014; **µMax = 0.0823 h^{-1}**

Tabla 16. Absorbancias medidas de la cinética de crecimiento.
Cepa 1F con parámetros 80 RPM, pH 6.0, 28°C, 1 VVM

Tiempo	Absorbancias			Abs X
0	0.108	0.108	0.111	0.109
1	0.120	0.121	0.122	0.121
2	0.141	0.146	0.145	0.144
3	0.211	0.208	0.208	0.209
4	0.279	0.279	0.276	0.278
5	0.320	0.324	0.325	0.323
6	0.407	0.411	0.412	0.410
7	0.484	0.489	0.488	0.487
8	0.475	0.480	0.479	0.478
9	0.468	0.472	0.473	0.471
10	0.501	0.506	0.508	0.505



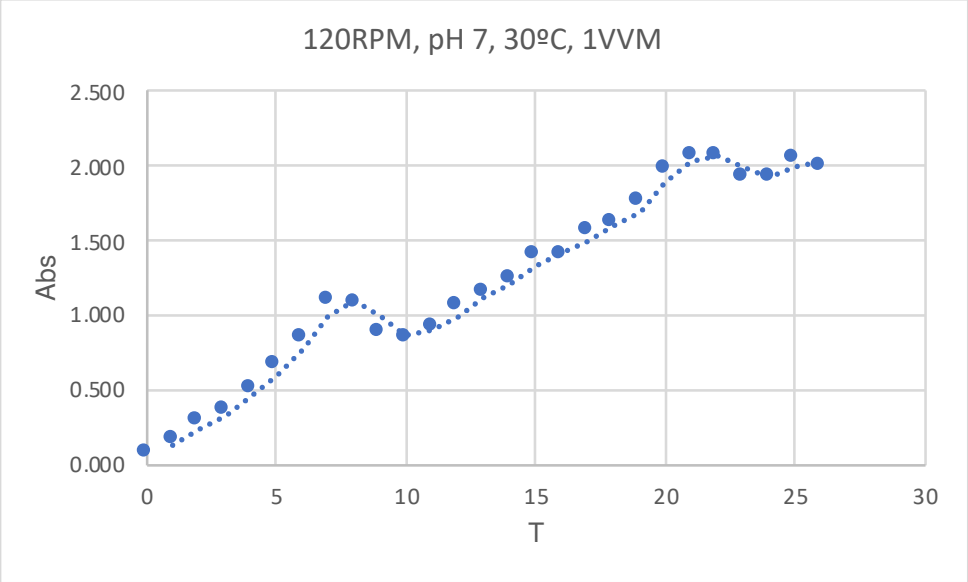


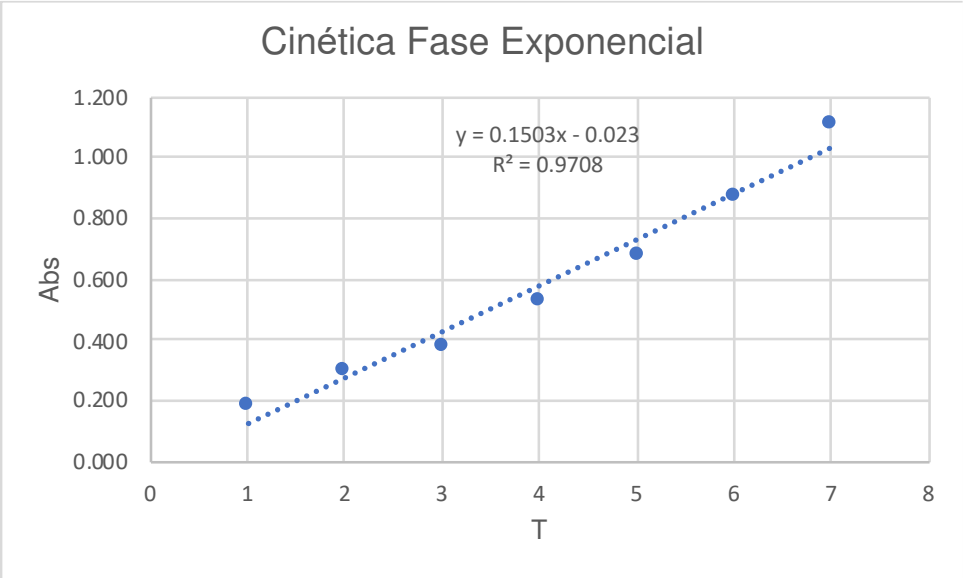
$X_f = \mu Max * \triangle t + X_0$	y = 0.0623x – 0.0326; **µMax = 0.0623 h^{-1}**

Tabla17. Absorbancias de la cinética de crecimiento.
Cepa 1F con parámetros 120 RPM, pH 7, a 30° C, 1 VVM

Tiempo	**Absorbancia**			**Abs *X***
0	0.101	0.090	0.103	0.098
1	0.185	0.186	0.189	0.187
2	0.298	0.304	0.302	0.301
3	0.379	0.375	0.380	0.378
4	0.527	0.522	0.524	0.524
5	0.676	0.679	0.679	0.678
6	0.868	0.869	0.866	0.868
7	1.110	1.114	1.112	1.112
8	1.088	1.089	1.087	1.088
9	0.89	0.892	0.893	0.892
10	0.861	0.862	0.863	0.862
11	0.934	0.935	0.937	0.935
12	1.067	1.072	1.079	1.073
13	1.161	1.16	1.159	1.160
14	1.262	1.261	1.251	1.258

15	1.42	1.426	1.428	1.425
16	1.414	1.412	1.415	1.414
17	1.578	1.571	1.573	1.574
18	1.626	1.632	1.63	1.629
19	1.764	1.768	1.77	1.767
20	1.993	1.997	1.995	1.995
21	2.073	2.071	2.069	2.071
22	2.078	2.077	2.078	2.078
23	1.941	1.937	1.915	1.931
24	1.93	1.931	1.932	1.931
25	2.054	2.059	2.056	2.056
26	2.012	2.012	2.012	2.012

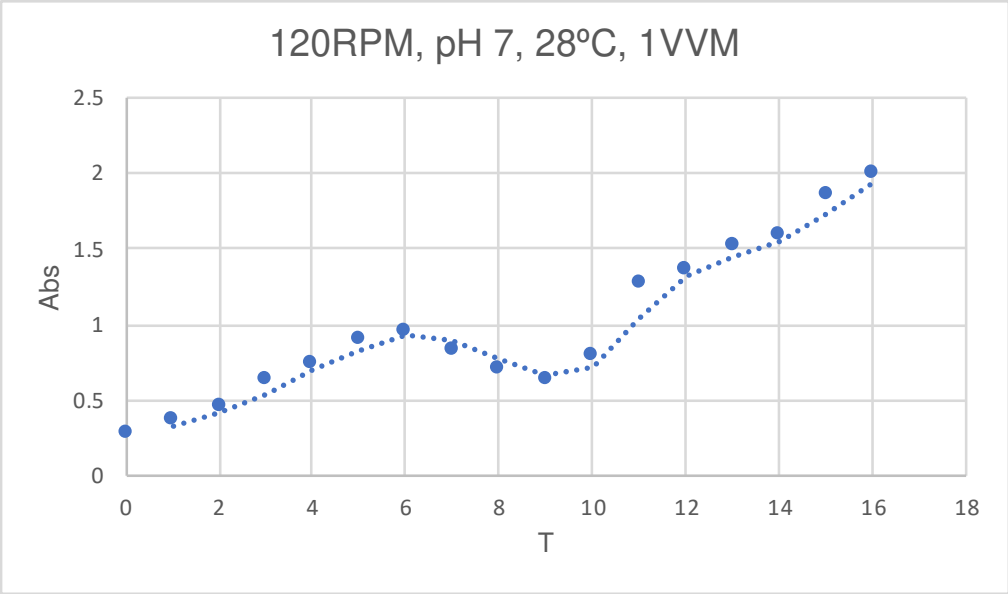


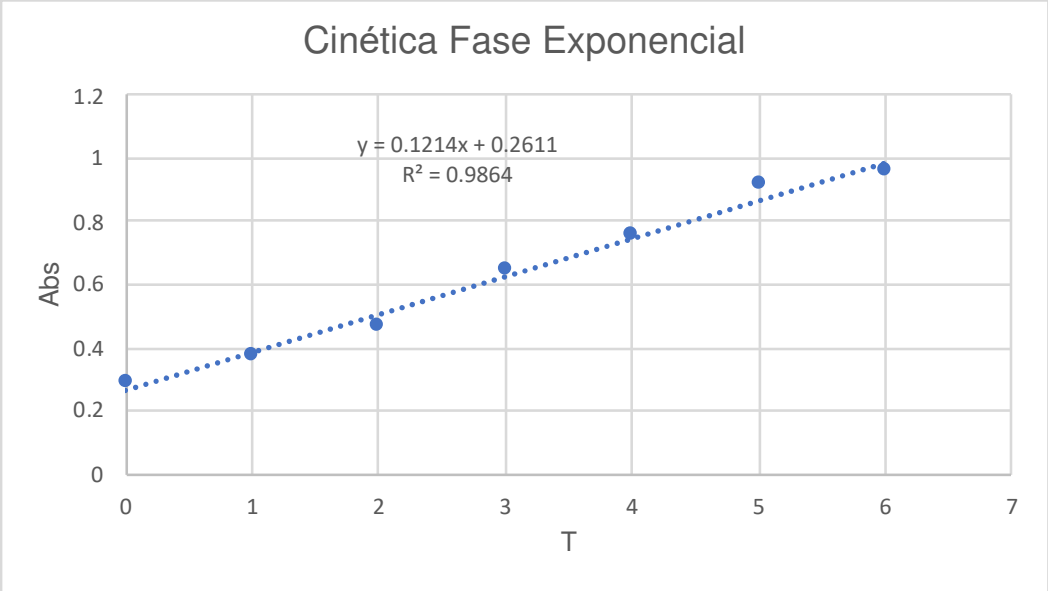


$X_f = \mu Max * \Delta t + X_0$	y = 0.1503x – 0.023; **µMax = 0.1503 h^{-1}**

Tabla 18. Absorbancias medidas de la cinética de crecimiento 1.
Cepa 1F con parámetros 120 RPM, pH 7.0, 28°C, 1 VVM

Tiempo	**Absorbancia**			**Abs *X***
0	0.282	0.283	0.284	0.283
1	0.371	0.368	0.369	0.369
2	0.46	0.461	0.463	0.461
3	0.642	0.643	0.646	0.644
4	0.748	0.756	0.75	0.751
5	0.905	0.909	0.919	0.911
6	0.958	0.957	0.958	0.958
7	0.834	0.835	0.837	0.835
8	0.701	0.708	0.708	0.706
9	0.64	0.642	0.647	0.643
10	0.796	0.799	0.798	0.798
11	1.281	1.275	1.276	1.277
12	1.366	1.36	1.361	1.362
13	1.516	1.518	1.519	1.518
14	1.606	1.607	1.601	1.605
15	1.814	1.898	1.896	1.869
16	2.006	2.004	2.001	2.004

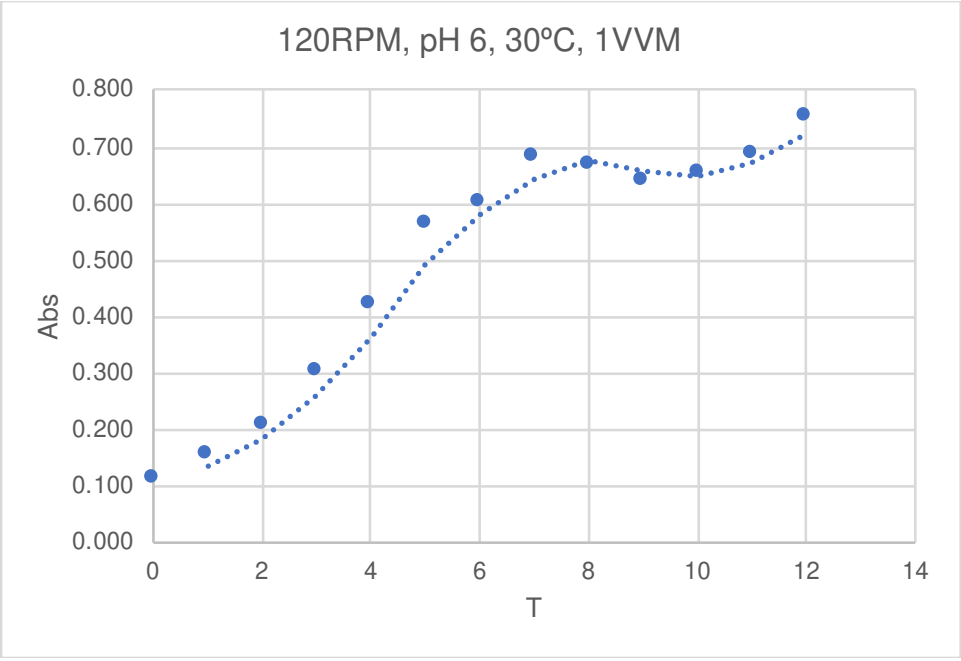


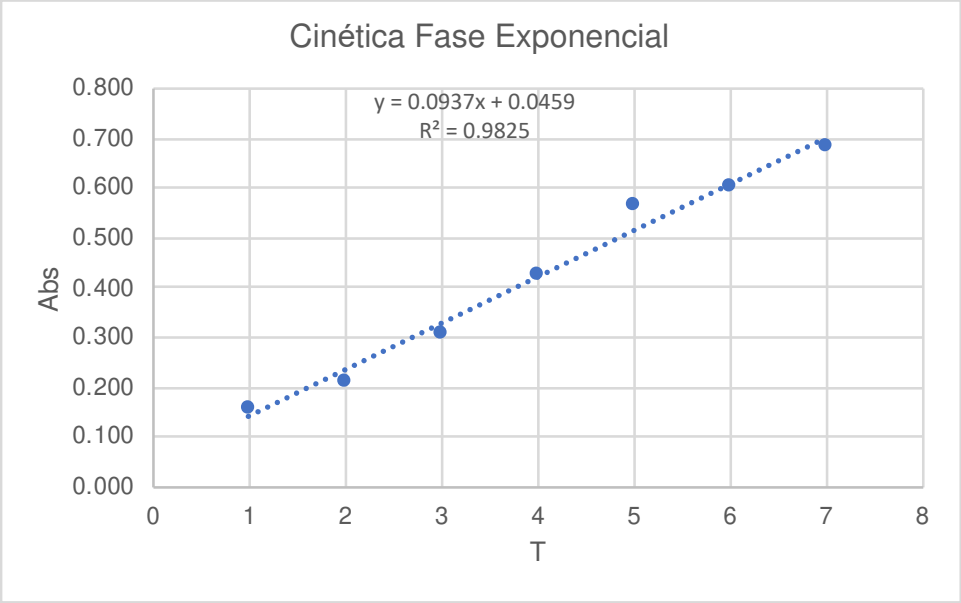


$X_f = \mu Max * \Delta t + X_0$	y = 0.1214x – 0.2611; **µMax = 0.1214 h^{-1}**

Tabla 19. Absorbancias medidas de la cinética de crecimiento.
Cepa 1F con parámetros 120 RPM, pH 6.0, 30°C, 1 VVM

Tiempo	Absorbancias			Abs X
0	0.117	0.118	0.116	0.117
1	0.160	0.156	0.155	0.157
2	0.207	0.208	0.212	0.209
3	0.306	0.305	0.307	0.306
4	0.419	0.423	0.424	0.422
5	0.566	0.563	0.569	0.566
6	0.600	0.601	0.605	0.602
7	0.682	0.682	0.685	0.683
8	0.667	0.668	0.669	0.668
9	0.641	0.645	0.643	0.643
10	0.655	0.654	0.656	0.655
11	0.688	0.688	0.691	0.689
12	0.757	0.758	0.756	0.757

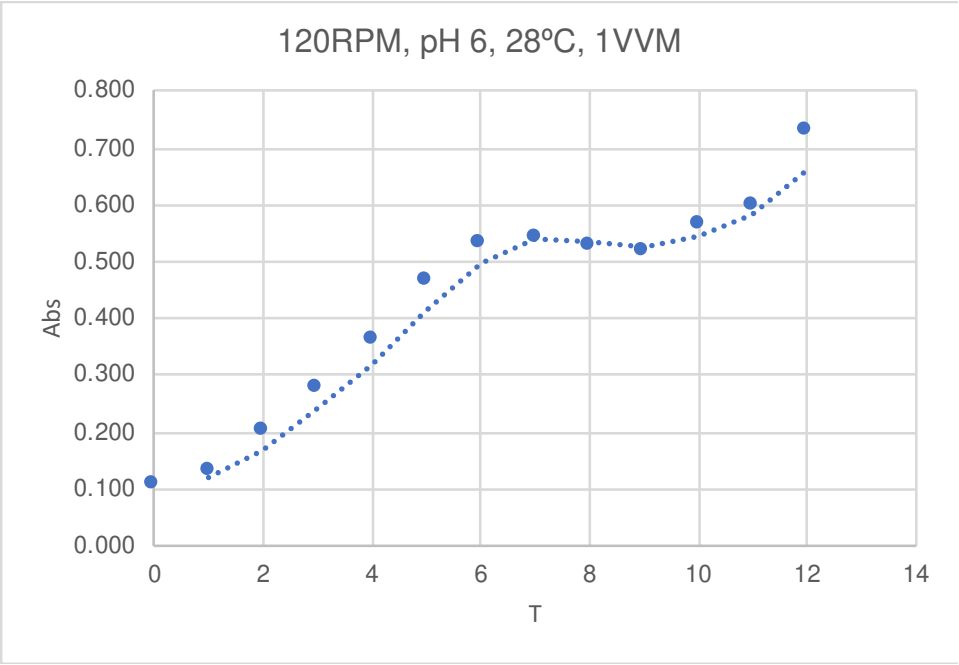


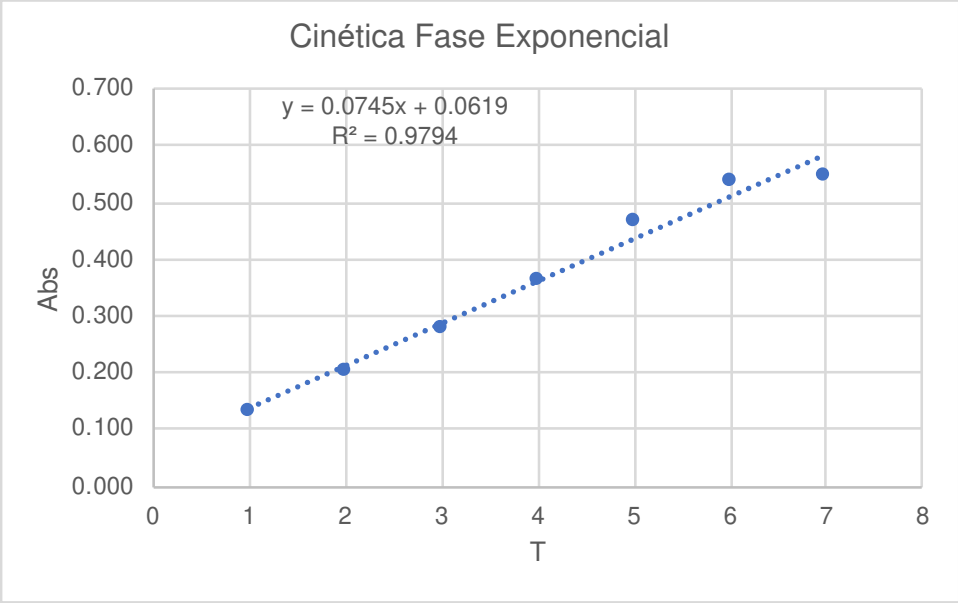


$X_f = \mu Max * \triangle t + X_0$	y = 0.0937x – 0.0459; **µMax = 0.0937 h^{-1}**

Tabla 20. Absorbancias medidas de la cinética de crecimiento.
Cepa 1F con parámetros 120 RPM, pH 6.0, 28°C, 1 VVM

Tiempo	Absorbancias			Abs X
0	0.112	0.108	0.110	0.110
1	0.129	0.134	0.133	0.132
2	0.202	0.205	0.202	0.203
3	0.278	0.279	0.277	0.278
4	0.359	0.363	0.364	0.362
5	0.470	0.463	0.462	0.465
6	0.530	0.537	0.535	0.534
7	0.543	0.543	0.546	0.544
8	0.531	0.527	0.526	0.528
9	0.518	0.522	0.523	0.521
10	0.565	0.567	0.566	0.566
11	0.595	0.597	0.599	0.597
12	0.729	0.731	0.733	0.731





$X_f = \mu Max * \triangle t + X_0$	y = 0.0745x – 0.0619; **µMax = 0.0745 h^{-1}**

Tabla 21 Determinación µ Max

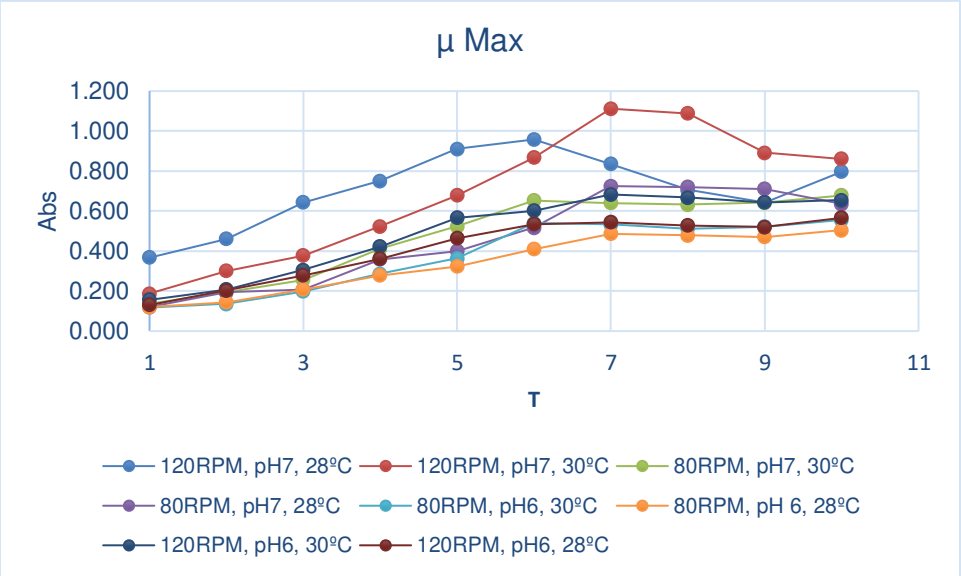


Figura 29. Análisis ANOVA – Fijación de Nitrógeno

Método

Hipótesis nula	Todas las medias son iguales
Hipótesis alterna	No todas las medias son iguales
Nivel de significancia	α = 0.05

Se presupuso igualdad de varianzas para el análisis.

Análisis de Varianza

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
Factor	11	9.3706	0.85187	76.34	0.0000000000000006
Error	24	0.2678	0.01116		
Total	35	9.6384			

Medias

Factor	N	Media	Desv.Est.	IC de 95%
2J	3	1.1631	0.0619	(1.0373; 1.2890)
2G	3	1.5370	0.1620	(1.4112; 1.6629)
1H	3	1.0798	0.0280	(0.9540; 1.2057)
2C	3	1.0456	0.1159	(0.9197; 1.1715)
1I	3	2.0496	0.1119	(1.9238; 2.1755)
1B	3	1.4280	0.1054	(1.3021; 1.5539)
1G	3	1.3189	0.1306	(1.1931; 1.4448)
2D	3	1.0689	0.0936	(0.9430; 1.1948)
2F	3	1.845	0.183	(1.719; 1.971)
2K	3	1.1597	0.0210	(1.0338; 1.2856)
1F	3	2.7547	0.0238	(2.6288; 2.8806)
1E	3	0.9322	0.0752	(0.8064; 1.0581)

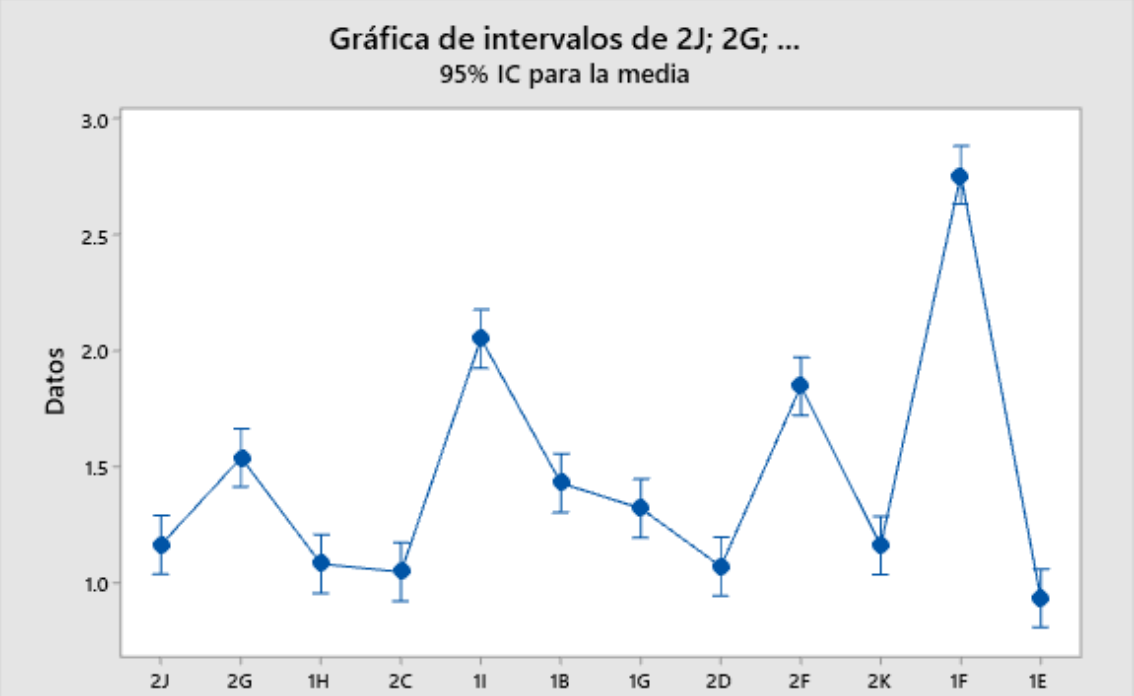
Desv.Est. agrupada = 0.105633

Figura 30. Prueba de Tukey – Fijación de nitrogéno

Agrupar información utilizando el método de Tukey y una confianza de 95%

Factor	N	Media	Agrupación
1F	3	2.7547	A
1I	3	2.0496	B
2F	3	1.845	B C
2G	3	1.5370	C D
1B	3	1.4280	D E
1G	3	1.3189	D E F
2J	3	1.1631	E F G
2K	3	1.1597	E F G
1H	3	1.0798	F G
2D	3	1.0689	F G
2C	3	1.0456	F G
1E	3	0.9322	G

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.



La desviación estándar agrupada se utilizó para calcular los intervalos.

Figura 31. Análisis ANOVA – Producción ácido indolacético

Método

Hipótesis nula	Todas las medias son iguales
Hipótesis alterna	No todas las medias son iguales
Nivel de significancia	α = 0.05

Se presupuso igualdad de varianzas para el análisis.

Análisis de Varianza

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
Factor	10	6308.9	630.89	24.62	0.0000000011
Error	22	563.7	25.62		
Total	32	6872.6			

Medias

Factor	N	Media	Desv.Est.	IC de 95%
1A	3	20.36	3.04	(14.30; 26.42)
2D	3	44.46	11.27	(38.40; 50.52)
1I	3	33.63	11.30	(27.57; 39.69)
1G	3	52.53	2.44	(46.47; 58.59)
1F	3	54.972	1.646	(48.912; 61.033)
1E	3	23.688	1.467	(17.627; 29.748)
2G	3	25.100	0.762	(19.039; 31.160)
2C	3	15.051	0.235	(8.991; 21.112)
2K	3	21.08	2.49	(15.02; 27.14)
2J	3	21.0339	0.0454	(14.9732; 27.0945)
2F	3	15.500	0.466	(9.440; 21.561)

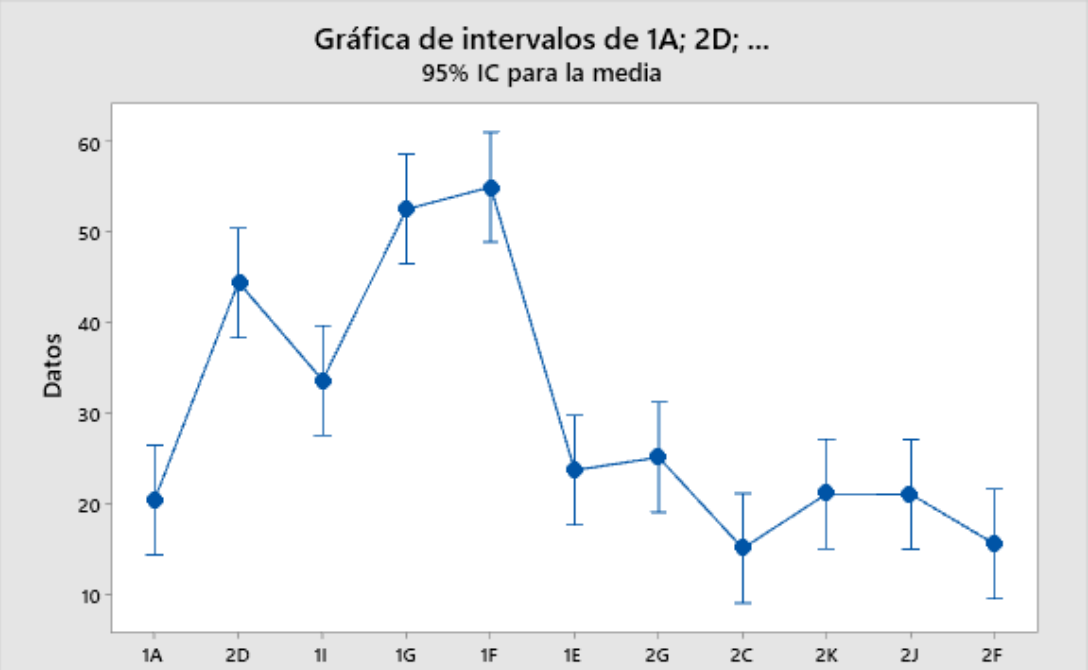
Desv.Est. agrupada = 5.06170

Figura 32. Prueba de Tukey – Producción ácido indolacético

Agrupar información utilizando el método de Tukey y una confianza de 95%

Factor	N	Media	Agrupación		
1F	3	54.972	A		
1G	3	52.53	A		
2D	3	44.46	A	B	
1I	3	33.63		B	C
2G	3	25.100			C D
1E	3	23.688			C D
2K	3	21.08			C D
2J	3	21.0339			C D
1A	3	20.36			C D
2F	3	15.500			D
2C	3	15.051			D

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.



La desviación estándar agrupada se utilizó para calcular los intervalos.

Figura 33. Análisis Factorial – CC 120RPM, pH 7, 30ºC, 1VVM

Análisis de Varianza

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
Modelo	8	0.007418	0.000927	28.11	0.00000001206
Lineal	4	0.007107	0.001777	53.86	0.00000000090
RPM	2	0.001437	0.000718	21.78	0.00001564088
Temp	2	0.005670	0.002835	85.95	0.00000000062
Interacciones de 2 términos	4	0.000311	0.000078	2.36	0.09220344536
RPM*Temp	4	0.000311	0.000078	2.36	0.09220344536
Error	18	0.000594	0.000033		
Total	26	0.008012			

H_0, No hay ningún efecto sobre el proceso f < p H_a, Si tiene un efecto sobre el proceso f > p

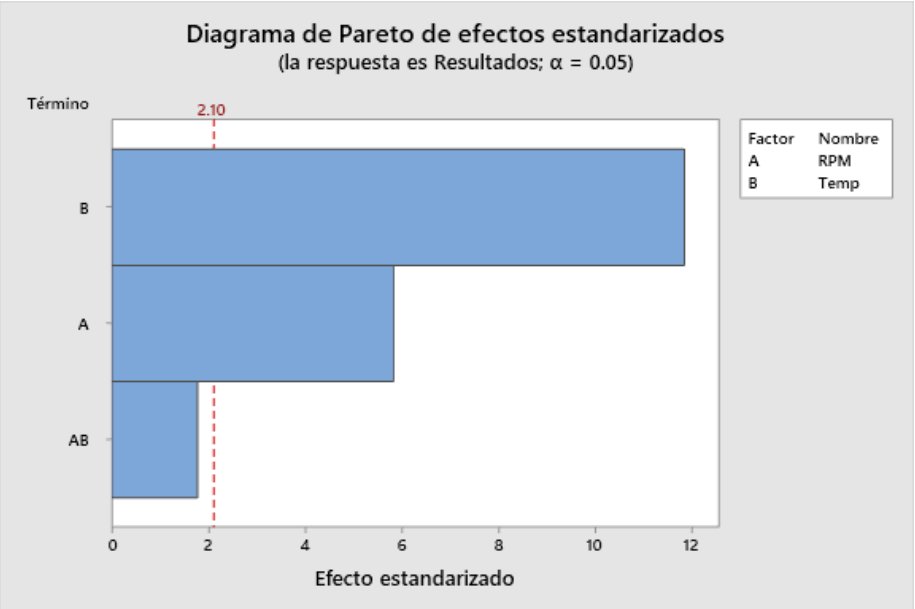


Figura 34. Análisis de Superficie de Respuesta – CC 120RPM, pH 7, 30ºC, 1VVM

