

UNIVERSIDAD MILITAR NUEVA GRANADA



**Desarrollo tecnológico de un biofertilizante con base en la  
bacteria diazotrófica *Azotobacter chroococcum*.**

Mauricio Camelo Rusinque

Tesis de Maestría

2010

## Tabla de contenido

<b>INTRODUCCION</b> .....	<b>6</b>
<b>MARCO TEORICO</b> .....	<b>8</b>
Fijación de Nitrógeno Mediada por Microorganismos .....	10
Bacterias de vida libre .....	11
<i>Azotobacter</i> spp. ....	12
Metabolismo .....	13
Biofertilización.....	13
<b>OBJETIVO GENERAL</b> .....	<b>16</b>
<b>OBJETIVOS ESPECÍFICOS</b> .....	<b>16</b>
<b>METODOLOGÍA</b> .....	<b>17</b>
<b>Objetivo 1.</b> Desarrollar el principio activo para la formulación del biofertilizante con base en la bacteria diazotrófica .....	17
Cepa de estudio.....	17
Colección de trabajo.....	17
Desarrollo del principio activo.....	17
Determinación condiciones de fermentación.....	17
<b>Objetivo 2.</b> Evaluar la capacidad de enquistamiento de la cepa AC1 de <i>Azotobacter chroococcum</i> .....	18
Enquistamiento de la cepa AC1 .....	18
Conteo de quistes y germinación .....	19
<b>Objetivo 3.</b> Evaluar la viabilidad y estabilidad in vitro del prototipo del inoculante biológico con base en la bacteria diazotrófica.....	20

Caracterización principio activo.....	20
Viabilidad.....	20
Recuento de contaminantes.....	20
Evaluación de la actividad.....	20
Fijación biológica de nitrógeno.....	20
Producción de compuestos indólicos: .....	21
Solubilización de fósforo in vitro: .....	21
Pruebas de estabilidad acelerada.....	22
<b>RESULTADOS Y DISCUSION.....</b>	<b>22</b>
Determinación condiciones de fermentación.....	22
Enquistamiento de la cepa AC1: .....	27
Caracterización principio activo.....	29
Estabilidad del principio activo .....	30
Análisis económico .....	33
<b>CONCLUSIONES.....</b>	<b>34</b>
<b>BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>35</b>
<b>ANEXOS .....</b>	<b>40</b>

## Lista de tablas

<b>Tabla 1.</b> Condiciones para el crecimiento de la cepa de Azotobacter chroococcum AC1 en el medio alternativo MBR .....	18
<b>Tabla 2.</b> Condiciones para la evaluación de los agentes de enquistamiento en fermentación discontinua de la cepa AC1. ....	19
<b>Tabla 3.</b> Análisis de Varianza para UFC/mL de Azotobacter chroococcum AC1 en relación a factores fisicoquímicos.....	23
<b>Tabla 4.</b> Correlación de máxima repuesta mediante la herramienta de optimización.....	27
<b>Tabla 5.</b> Porcentaje de enquistamiento obtenido en cada uno de los tratamientos evaluados.....	27
<b>Tabla 6.</b> Resultados de la caracterización del producto de la fermentación de la cepa AC1 en el medio de cultivo MBR, comparados frente a la NTC 349/07 .....	30
<b>Tabla 7.</b> Análisis comparativo de costos de producción biofertilizante MONIBAC y AC1 en presentación líquida .....	34

## Lista de figuras.

<b>Figura 1.</b> Grafico de Probabilidad Normal para la variable de respuesta evaluada para el estudio.....	23
<b>Figura 2.</b> Diagrama de Pareto para condiciones de fermentación evaluadas con un alfa = 0.05.....	24
<b>Figura 3.</b> a.) Superficie estimada de correlación para Agitación y pH. b.) Superficie estimada de correlación para Aireación y pH. c.) Superficie estimada de correlación para Aireación y pH.....	25
<b>Figura 4.</b> Viabilidad de la cepa AC1 después del enquistamiento durante 105 días de evaluación bajo tres temperaturas de almacenamiento .....	31
<b>Figura 5.</b> Producción de índoles totales por parte de la cepa AC1 después del enquistamiento durante 105 días de evaluación bajo tres temperaturas de almacenamiento.....	32
<b>Figura 6.</b> Producción de fosforo disponible por parte de la cepa AC1 después del enquistamiento durante 105 días de evaluación bajo tres temperaturas de almacenamiento.....	33
<b>Figura 7.</b> Actividad de la enzima nitrogenasa por parte de la cepa AC1 después del enquistamiento en el tiempo cero y a los 105 días de evaluación bajo tres temperaturas de almacenamiento.....	33

## INTRODUCCION

El uso indiscriminado de fertilizantes químicos ha causado pérdidas en la productividad de los suelos donde se realizan prácticas agrícolas incorrectas, las cuales como consecuencia ocasionan la degradación de las propiedades biológica, físicas y químicas del suelo. Por esta razón el uso de biofertilizantes ha tomado cada vez más fuerza, ya que se puede recuperar la fertilidad de las tierras, al aportar microorganismos benéficos que ayudan mediante la descomposición inicial de la materia orgánica a conseguir un equilibrio ecológico por medio de la liberación de nutrientes inorgánicos aumentando la productividad de los suelos de cultivo.

La producción ganadera colombiana ha ocasionado la degradación de los suelos productivos, del Valle del Cesar. Como tecnología alternativa para la producción ganadera se ha implementado la utilización de un biofertilizante con base en la bacteria fijadora de nitrógeno, de vida libre *Azotobacter chroococcum* aplicado sobre gramíneas, en los sistemas productivos del Valle del Cesar, sobre pasto Guinea (*Panicum maximum*) uno de los principales componentes de los sistemas silvopastoriles del Caribe seco colombiano. El uso de este biofertilizante ha demostrado un aumento en la productividad en cultivos de gramíneas hasta en un 50% bajo condiciones de invernadero (Cardenas, 2007) y 30% en parcelas experimentales (Bonilla *et al.*, en preparación). Estas bacterias son capaces de aumentar la disponibilidad de nitrógeno en el agro ecosistema. El nitrógeno es uno de los elementos más limitantes para el crecimiento de las plantas (Baca *et al.*, 2000), por esta razón, el empleo de estos biofertilizantes representan una alternativa económica rentable para los agricultores y ganaderos de la región, debido a que su uso puede reducir hasta en un 50% la aplicación de fertilizantes nitrogenados de síntesis química. La Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria –CORPOICA- ha desarrollado un biofertilizante con base en la bacteria diazotrófica nativa del Valle del Cesar, la cual ha demostrado su eficacia en el cultivo de pasto Guinea (*Panicum maximum*), en la estación experimental Motilonia en el Departamento del Cesar, sin embargo el desarrollo de estos productos se realizó empleando métodos de producción artesanal. La producción artesanal de biofertilizantes posee varios limitantes, tales como que el soporte

solido utilizado es un recurso natural no renovable, razón por la cual su utilización en la producción masiva de biofertilizantes, se ve limitada porque en nuestro país no existen depósitos naturales de turba y en los países en donde estos depósitos existen, la turba se encuentra en ecosistemas de humedales que son protegidos por su importancia ambiental. Además la formulación actual de estos bioproductos requiere que el producto terminado sea almacenado en refrigeración ( $4\pm 2^{\circ}\text{C}$ ), con una vida útil de 6 meses, estas condiciones hacen que la producción y comercialización del bioproducto sea limitada y costosa. Por esta razón, es necesario evaluar prototipos de soportes inorgánicos de bajo costo, que sean amigables con el ambiente y que permitan obtener biofertilizantes que no necesiten refrigeración y con una vida útil superior. Estas mejoras permitirán impactar un mayor número de agricultores y ganaderos generando una transferencia de tecnología directa al sector agropecuario

## **MARCO TEORICO**

En Colombia la superficie total agropecuaria está estimada en 51.008.326 Ha, de las cuales el renglón pecuario ocupa 37.185.336 Ha (Garrido, 2007). La mayor parte del área pecuaria está dedicada al cultivo de pastos para la ganadería bovina. Del área empleada al cultivo de pastos, un 70% son manejadas bajo sistemas de producción extensivos, con una capacidad de carga promedio de 0.9 animales por hectárea y una producción aproximada en los sistemas extensivos mejorados (Rojas y col., 2008)

El Caribe seco colombiano posee aproximadamente 3.3 millones de hectáreas sembradas con pasto y una población bovina de 6.9 millones cabezas de ganado, generando el 38.7% de la leche y el 38% de la producción de carne del país (Cuesta, 2005). Desde hace ya varios años, el departamento del Cesar es el principal departamento ganadero de la Costa Caribe, pues posee un hato con aproximadamente 1.5 millones de cabezas, representando el 6% del hato colombiano y el 20% de la región (Cuesta, 2005).

Los sistemas de producción intensivos empleados en la región del Caribe Seco, han ocasionado problemas ambientales, sociales y económicos, debido al mal manejo del recurso suelo donde constantemente se generan procesos de degradación. Por esta razón se considera que cerca del 90% de los suelos utilizados en la actividad agropecuaria de la región Caribe Colombiana han sufrido diversos niveles de deterioro físico, químico y biológico, que afectan severamente su capacidad productiva debido a que comprometen a mediano y largo plazo la viabilidad económica de los sistemas ganaderos (Cuesta, 2005). Esto debido a factores como la fertilización con sustancias de síntesis química, la disminución en la biodiversidad ocasionada por la intervención de tipo industrial y el daño, en general, que se ha causado a la integridad de los ecosistemas suelo, agua y aire (Bonilla y Murillo, 1992).

Es importante resaltar que la implementación de tecnologías con el ánimo de incrementar la producción de gramíneas, ha conllevado a la utilización de grandes volúmenes de productos nitrogenados y fosfatados de síntesis. Los sistemas



económicos mundiales promueven el consumo y las formas de producción de los países, aumentando los problemas medio ambientales causados por los procesos productivos. Se reporta la utilización de  $77 \times 10^6$  toneladas de nitrógeno aplicadas mundialmente como fertilizante. Para la producción de estos fertilizantes se requiere la utilización de aproximadamente  $91 \times 10^9$  toneladas de combustible fósil que corresponde a cerca de 1.4% de todo el combustible fósil consumido mundialmente (Marin *et al.*, 2003). Lo anterior ha provocado diferentes efectos negativos en los recursos naturales, tales como acumulación de nitratos en aguas freáticas, toxicidad en las plantas por la presencia de altos niveles de  $\text{NO}_2$  en los suelos, contribuyendo con la muerte de la biota del suelo, ocasionando desequilibrios en los ciclos biogeoquímicos, conllevando un alto costo económico, social y ecológico, representados en la disminución de la productividad ganadera, y en general de los sistemas de producción intensivos (Bonilla y Murillo, 1992).

Sin embargo, en las últimas décadas ha aumentado la preocupación por la degradación de los ecosistemas y el deterioro de los recursos naturales. La pérdida de biodiversidad, el cambio climático, la destrucción de la capa de ozono, el efecto invernadero y la escasez de agua, son las preocupaciones ambientales que han tomado especial importancia en el ámbito mundial y local (Steenhoudt y Vanderleyden, 2000).

Para aumentar la productividad de la ganadería y contribuir a la preservación del ambiente, se ha planteado la utilización de otros sistemas productivos que representan una alternativa económica interesante, y sobre todo amigable con el ambiente. Este es el caso de los sistemas silvopastoriles, definidos por Mahecha (2002) como sistemas de producción pecuarios en donde las plantas leñosas perennes interactúan con los componentes tradicionales bajo un sistema de manejo integral.

En los sistemas ganaderos y en general, en la mayoría de los sistemas productivos, el nitrógeno es generalmente considerado el nutriente más limitante para el crecimiento de las plantas en su ambiente natural (Soto y Pardo, 2000). Es por esta razón que el nitrógeno presente en la atmósfera terrestre, en forma molecular ( $\text{N}_2$ ), es la reserva más grande en la naturaleza. Aunque la abundancia de esta fuente es bastante grande, no es utilizada por las plantas directamente. La

asimilación del nitrógeno en forma molecular necesita de un proceso de reducción, realizado solamente por organismos pertenecientes a los dominios Archea y Eubacteria. Estos organismos son capaces de realizar la Fijación Biológica de Nitrógeno (FBN), la cual es un proceso vital para el ciclaje del nitrógeno en la biósfera, para que el nitrógeno molecular pueda ser incorporado a las moléculas fundamentales de todos los seres vivos tales como los aminoácidos, las proteínas, los ácidos nucleicos, las vitaminas, entre otros (Baca *et al.*, 2000).

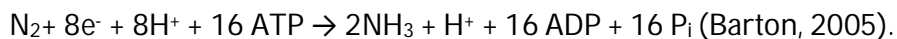
De forma natural existen dos maneras de fijar nitrógeno, mediante abundante energía lumínica produciendo ionización en las moléculas de la atmósfera, haciéndolas disponibles para reaccionar y formar óxidos de nitrógeno, los que al ser disueltos por la lluvia, forman nitritos ( $\text{NO}_2^-$ ) y nitratos ( $\text{NO}_3^-$ ) los cuales son llevados al suelo. Esta forma de fijación de nitrógeno atmosférico probablemente contribuye con el 10% del total anual de nitrógeno fijado (Newton y Fisher, 2002).

Es por esto que la fuente más importante de nitrógeno fijado se deriva de la actividad microbiana selecta del suelo, donde los microorganismos absorben el nitrógeno atmosférico y lo convierten en amonio. Algunos de estos microorganismos se encuentran libres en el suelo y se alimentan de materia orgánica muerta, otros se encuentran creciendo en asociación con las raíces de plantas mayores y otros tienen la capacidad de establecer relaciones de tipo simbiótico con algunos tipos de plantas donde suplen a la bacteria con la energía para crecer (compuestos carbonatados), mientras que la bacteria suple a la planta con nitrógeno fijado. Estos procesos biológicos contribuyen con alrededor del 65% de la producción total anual de nitrógeno fijado (Newton y Fisher, 2002).

### **Fijación de Nitrógeno Mediada por Microorganismos**

Varios microorganismos han sido reportados por su capacidad para fijar nitrógeno atmosférico, Winogradsky aisló en 1890 la bacteria anaerobia fijadora de nitrógeno *Clostridium pasteurianum*, mientras en 1901, Beijerinck aisló la bacteria fijadora de nitrógeno aerobio a partir de suelo *Azotobacter chroococcum*, la cual al igual que algunos de los cultivos bacterianos más recientes, es capaz de convertir el nitrógeno atmosférico ( $\text{N}_2$ ) a amonio ( $\text{NH}_3$ ). La fijación biológica de nitrógeno (FBN) es encontrada solo en procariotas y es característica de algunas especies de cianobacterias (*Anabaena* y *Aphanazonemon*), bacterias heterotróficas aerobias del

suelo (*Azotobacter*, *Azospirillum*, *Klebsiella*, *Beggiatoa*, y *Frankia*), bacterias anaerobias (*Clostridium* y *Desulfovibrio*), bacterias simbióticas creciendo en raíces de leguminosas (*Sinorhizobium*, *Rhizobium*, y *Bradyrhizobium*), y algunas especies de archaeas (*Methanosarcina* y *Methanococcus*). La reacción general de fijación de nitrógeno es:



Estos microorganismos se conocen como fijadores de nitrógeno o diazótrofos, gracias a que poseen el complejo enzimático conocido como nitrogenasa, el cual les permite fijar nitrógeno atmosférico (Newton y Fisher, 2002). Los diazótrofos están presentes en casi todos los ecosistemas, teniendo así representantes en ambientes como la superficie oceánica (*Tricodesmium*), nódulos de las raíces de las plantas (*Rhizobium*), y en suelos aeróbicos como es el caso de *Azotobacter*. Se distinguen tres formas mediante las cuales los microorganismos pueden llevar a cabo la FBN: asociaciones simbióticas, simbiosis asociativas, y bacterias de vida libre (Espín, 2007; Newton y Fisher, 2002).

### **Bacterias de vida libre**

En su mayoría las bacterias fijadoras de  $\text{N}_2$ , no están asociadas a plantas o animales. Estas viven libres en el suelo y fijan nitrógeno para su propio beneficio, de estas bacterias de vida libre, las cianobacterias son las más importantes dentro del ámbito agrícola. Las especies bacterianas de vida libre más ampliamente estudiadas son *Azotobacter vinelandii* (aerobio obligado), *Klebsiella pneumoniae* (anaerobio facultativo), *Clostridium pasteurianum* (anaerobio obligado), *Rhodobacter capsulatus* (bacterias fotosintética) y varias especies de *Anabaena* y *Nostoc* (cianobacterias formadoras de heteroquistes). El nitrógeno fijado por estos organismos solo llega a ser disponible para el ecosistema circundante, generalmente cuando la bacteria muere (Newton y Fisher, 2002).

Debido a que el mayor factor limitante de la FBN es la fuente de energía carbonada, es razonable predecir que los diazótrofos fotosintéticos de vida libre podrían fijar

grandes cantidades de  $N_2$  bajo algunas condiciones de suelo que los heterótrofos de vida libre y que estos últimos podrían fijar cantidades medibles de  $N_2$  solo en presencia de derivados carbonados disponibles producidos por la planta, como por ejemplo carbono lábil en la zona rizosférica de una planta activa en crecimiento, o durante la descomposición de residuos de plantas o arboles con una elevada relación C:N. Las bacterias diazótrofes anaerobias facultativas y obligadas son a menudo encontradas en madera en descomposición, donde se asume que hongos celulíticos y ligniolíticos depolimerizan los azúcares y compuestos fenólicos necesarios para dar soporte a los diazótrofes.

Hay muchas rizobacterias fijadoras de nitrógeno de vida libre, contribuyendo a la fijación de nitrógeno desde la atmósfera hacia las plantas, incluyendo cultivos agrónomicamente importantes. Los diazótrofes en la rizósfera pertenecen a una amplia variedad de géneros de los cuales los más investigados han sido *Azotobacter* y *Azospirillum*, aunque muchos otros han sido reportados al poseer una asociación con gramíneas tropicales y arroz.

### ***Azotobacter* spp.**

*Azotobacter* sp, es un microorganismo habitante regular del suelo, fijador de nitrógeno y productor de sustancias de crecimiento vegetal. Se encuentra generalmente asociado a la rizósfera (zona de raíces) y en las hojas (filósfera) de muchas plantas, forma unas estructuras especiales llamadas quistes, se han demostrado reducciones de la fertilización nitrogenada en un 40% e incremento de los rendimientos en un 25 a 50% en hortalizas con la utilización de *Azotobacter* spp, aumentos del 11% en rendimiento de zanahoria en maíz de 44% y en arroz del 8% y en un 16% en cebada; se han demostrado efectos positivos en tomate, trigo, papa y girasol; así mismo *Azotobacter* es capaz de fijar al menos 10 mg de  $N_2$  por gramo de carbohidrato (Tejera *et al.*, 2005), pero su distribución ecológica depende fuertemente de materia orgánica, humedad, relación de C/N y pH (Tejera *et al.*, 2005).

## **Metabolismo**

Son quimioheterótrofos, utilizan azúcares, alcoholes y sales inorgánicas para crecer. Son fijadores de nitrógeno; en vida libre fijan al menos 10 mg de N<sub>2</sub> por gramo de carbohidrato (glucosa) consumido. Requieren molibdeno para fijar nitrógeno que puede ser parcialmente reemplazado por vanadio. Utilizan nitrato y sales de amonio y ciertos aminoácidos como fuentes de nitrógeno. Son catalasa y oxidasa positivas, reducen nitrato, producen H<sub>2</sub>S e hidrolizan almidón (Espín, 2007; Kozubeck *et.al.*, 1998). Según Sadoff (1975) este género comprende células Gram-negativas, polimórficas que se reproducen por fisión binaria y presentan la capacidad para sintetizar dos polímeros de importancia industrial: alginato y polihidroxibutirato (PHB). Algunas especies como *A. vinelandii* y *A. chroococum* presentan además la capacidad de diferenciarse en células esféricas llamadas quistes. Este estadio se presenta cuando se remueve la glucosa del medio de cultivo y se adiciona un inductor de enquistamiento como el  $\beta$ -hidroxibutirato.

Los quistes producidos por las bacterias del género *Azotobacter* se caracterizan por ser esféricos, producidos por el acortamiento y redondeo de una sola célula vegetativa con una doble capa que rodea la estructura entera (Socolofsky y Wyss, 1969). Esta capsula ofrece protección a algunas condiciones de stress ambiental. Los quistes de *Azotobacter* han demostrado mayor resistencia, que las células vegetativas, al calor, sonicación y tratamientos con luz ultravioleta.

## **Biofertilización**

Dada la importancia del nitrógeno, su baja disponibilidad en el suelo, y los altos impactos económicos y ecológicos generados por el uso de fertilizantes de síntesis química, se ha propuesto a la FBN como modelo y alternativa limpia y eficiente para solucionar el problema de la baja disponibilidad de nitrógeno en suelo y de esta forma aumentar la productividad del sistema ganadero (Sylvia *et al.*, 2005). Durante las últimas décadas, el uso de biofertilizantes se ha convertido en una manera de generar procesos rápidos, debido principalmente a su origen microbiano. Las ventajas que presenta el uso y producción de este tipo de bioinsumos, pueden resumirse en un bajo consumo de energía no renovable, no

generan un impacto medioambiental negativo y se ha reportado la capacidad de competir antagónicamente frente a microorganismos fitopatógenos (Tovar *et al.*, 1999). El uso de fertilizantes biológicos permite la sostenibilidad de los sistemas productivos, mitigando el efecto del abuso en el uso de fertilizantes de síntesis, aumentando la captura de carbono y reduciendo la emisión de gases que generan el efecto invernadero. Además, los fertilizantes biológicos abren la posibilidad de utilizar la biodiversidad microbiana presente en la rizósfera de los suelos productivos, disminuyendo los costos de producción, evitando la fuga de divisas y permitiendo que los sistemas de producción intensivos sean más competitivos y sostenibles (Tovar *et al.*, 1999).

La producción de biofertilizantes con base en bacterias fijadoras de nitrógeno comenzó con inoculantes que utilizaban bacterias diazotróficas del género *Rhizobium* sp., utilizado para cultivos de leguminosas como la soya, frijol, trébol, leucaena y kudzú, entre otros. Sin embargo, para el caso de nuestro país, los procesos desarrollados para la producción masiva de biofertilizantes, se basan en la utilización de soportes orgánicos como los suelos de capote o turbas importadas de alto costo, que generan un impacto no deseado sobre el medio ambiente. En los últimos años ejemplos del uso de este tipo de tecnologías, han demostrado que *Azotobacter* sp., es una bacteria con capacidad fijadora de nitrógeno, utilizada en cultivos de interés comercial (Bonilla y Novo, 1998). Este es el caso del producto comercial MONIBAC, desarrollado por Corpoica, cuyo ingrediente activo es *Azotobacter chroococcum*, el cual, al ser inoculado en forma directa sobre las semilla de algodón y de pasto, disminuyó el tiempo de germinación, en las pruebas de invernadero, así como, un considerable aumento en los rendimientos de producción en las pruebas de campo y con una reducción en la aplicación de fertilizantes de síntesis química, hasta de un 50% (Bonilla *et al.*, 2002, Bonilla y Morales, 2005 )

Actualmente en Corpoica, la producción de biofertilizantes a escala piloto se desarrolla siguiendo los parámetros establecidos para la obtención de productos de altísima calidad. Sin embargo, este proceso consta de la utilización de un soporte sólido caracterizado como un suelo de capote suplementado, con alto contenido de materia orgánica similar a la turba. Este soporte permite la adsorción

del microorganismo para la obtención de un producto estable, con una vida útil de 6 meses en condiciones de refrigeración y una concentración celular superior a  $10^8$  UFC/g. Sin embargo, la utilización de este tipo de soporte para la producción de inoculantes genera impactos negativos en el ambiente. Este fenómeno se debe al proceso desarrollado para la obtención del soporte en mención pues, es un recurso no renovable. Por esta razón la utilización de este tipo de sustrato genera procesos de erosión y degradación de suelos potencialmente productivos, aumentando los problemas medio ambientales generados por las malas prácticas agrícolas. Además, se debe mencionar que la formulación empleada presenta un alto costo de producción debido a que el esquema propuesto exige la refrigeración del producto terminado, haciendo de este factor una limitante para la utilización de la tecnología en los sistemas agropecuarios de nuestro país, (Bonilla y Morales, 2005).

En el ámbito nacional, la producción de biofertilizantes es incipiente, no obstante, el potencial existente en el país es bastante amplio, debido a las tendencias mundiales de la utilización de tecnologías limpias para la producción agrícola, utilizando procesos de alta calidad que permitan mejorar la calidad de vida de los productores agropecuarios colombianos. Por esta razón se plantea como objetivo de este proyecto de investigación evaluar un prototipo de biofertilizante con base en la bacteria diazotrófica *Azotobacter chroococcum*, el cual pueda ser aplicado a cultivos de pastos en sistemas silvopastoriles y mejorar así la sostenibilidad de estos sistemas ganaderos de leche.

## **OBJETIVO GENERAL**

Contribuir con el desarrollo de inoculantes biológicos de fácil aplicación para disminuir la fertilización nitrogenada de síntesis en sistemas silvopastoriles.

## **OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

1. Desarrollar el principio activo para la formulación del biofertilizante con base en la bacteria diazotrófica
2. Evaluar la capacidad de enquistamiento de la cepa AC1 de *Azotobacter chroococcum*
3. Evaluar la viabilidad y estabilidad *in vitro* del prototipo del inoculante biológico con base en la bacteria diazotrófica



## METODOLOGÍA

### **Objetivo 1. Desarrollar el principio activo para la formulación del biofertilizante con base en la bacteria diazotrófica**

#### **Cepa de estudio**

Se evaluó la cepa fijadora de nitrógeno, *Azotobacter chroococcum* AC1, perteneciente al banco de microorganismos del Laboratorio de Microbiología de Suelos de la Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria (CORPOICA) con sede en Tibaitatá, ubicada en el municipio de Mosquera, Cundinamarca.

#### **Colección de trabajo**

La cepa AC1 *Azotobacter chroococcum* se sembró en cajas de Petri con medio sólido Ashby. Posteriormente se incubó por 72 horas a  $30\pm 2^{\circ}\text{C}$ , este procedimiento se realizó con el fin de reactivar y verificar la pureza del microorganismo. A partir de la biomasa recuperada se preparó un cultivo líquido, en caldo Ashby, con un volumen efectivo de trabajo (VET) de 70 mL en un erlenmeyer de 500 mL. Este cultivo se incubó durante 72h a 120rpm a  $30\pm 2^{\circ}\text{C}$ , una vez este proceso finalizó, la cepa fue crioconservada siguiendo el protocolo para la elaboración del banco de cepas (IN-R-315) desarrollado en el laboratorio de Microbiología de Suelos de CORPOICA. Para tal fin fue necesario preparar una solución crioconservante con glicerol al 30% estéril (15psi,  $121^{\circ}\text{C}$ , 15min). Esta solución fue mezclada con el cultivo bacteriano de 72h de edad, bajo condiciones de esterilidad. La suspensión obtenida se dividió en alícuotas de 1 mL y almacenadas en tubos Eppendorf previamente estériles. Los tubos fueron almacenados en un congelador a  $-20^{\circ}\text{C}$ .

#### **Desarrollo del principio activo**

##### **Determinación condiciones de fermentación**

Fermentaciones discontinuas se llevaron a cabo utilizando un biorreactor de tanque agitado, con volumen total de 5 L y volumen efectivo de trabajo de 3.5 L, con una configuración tipo Rushton (MINIFORS modelo INF-30174). Para la determinación de las condiciones del proceso de fermentación fue necesario, evaluar tres parámetros esenciales para el desarrollo del microorganismo en el sistema. Estos parámetros se encuentran consignados en la tabla 1. El diseño

experimental usado fue un diseño factorial completo de resolución 5 con 8 tratamientos por triplicado, para un total de 24 ejecuciones. El medio de cultivo utilizado para la multiplicación del microorganismo es el MBR propuesto por Moreno *et al.* (2009). Todos los tratamientos fueron inoculados con una suspensión bacteriana de la cepa AC1 de 35 mL, correspondiente al 1% del VET, con una concentración celular ajustada a una  $DO=0.20_{540nm}$ .

**Tabla 1.** Condiciones para el crecimiento de la cepa de *Azotobacter chroococcum* AC1 en el medio alternativo MBR

Tratamiento	Condiciones		
	Aireación (lpm)	Agitación (rpm)	pH
1	1	300	libre
2	1	300	7,2
3	1	500	7,2
4	1	500	libre
5	2	300	7,2
6	2	500	libre
7	2	500	7,2
8	2	300	7,2

## **Objetivo 2: Evaluar la capacidad de enquistamiento de la cepa AC1 de *Azotobacter chroococcum***

### **Enquistamiento de la cepa AC1**

Se utilizó el medio de cultivo MBR Moreno *et al.* (2009) en fermentación discontinua durante 24 horas a 120 rpm y  $30\pm 2^{\circ}C$ , utilizando erlenmeyers con un volumen de 125 mL. A las 24 horas de fermentación, en la fase estacionaria del microorganismo, se indujo el enquistamiento de la cepa AC1 de *Azotobacter chroococcum*. Para esto se evaluaron dos agentes de enquistamiento codificados como AE01 y AE02 cada uno adicionado en tres diferentes concentraciones (Tabla 2). Los agentes de enquistamiento tuvieron un tiempo de contacto con el microorganismo de 5 días bajo las mismas condiciones de fermentación previamente descritas. Este procedimiento se realizó por triplicado, empleando un diseño experimental completamente aleatorizado.

**Tabla 2.** Condiciones para la evaluación de los agentes de enquistamiento en fermentación discontinua de la cepa AC1.

Tratamiento	Condiciones	
	Agente	Concentración (%)
1	-	-
2	AE01	0.4
3	AE01	0.7
4	AE01	1.0
5	AE02	0.4
6	AE02	0.7
7	AE02	1.0

### Conteo de quistes y germinación

El número de quistes en la fermentación fue estimado por medio de conteo del número de células capaces de resistir a la desecación, siguiendo la metodología planteada por Campos *et al* (1996). Para esto fue necesario utilizar el medio MBR suplementado con sucrosa. Las células resistentes a la desecación fueron obtenidas a partir de la fase estacionaria del cultivo bacteriano (24h), derivado de las fermentaciones suplementadas con el inductor de enquistamiento. Para contar el número de quistes se tomó una alícuota de 2ml, de la fermentación obtenida, y se filtró a través de un filtro Millipore de nitrocelulosa con un tamaño de poro de 0.45µm. Las membranas fueron lavadas con agua estéril y puestas en cajas de petri vacías, posteriormente las placas se colocaron en incubación durante 5 días a 30°C. Las células secas se liberaron de la membrana adicionando 1ml de medio MBR mineral (sin fuentes de carbono) y agitando las cajas petri en un shaker a 80rpm, durante 24h a 28°C. Las células recuperadas en la suspensión fueron sembradas en medio MBR solido suplementado con sucrosa y se contaron el número de colonias obtenidas después de 3 días de incubación a 28°C. Este número se considero directamente proporcional al número de células resistentes a la desecación (quistes) provenientes del proceso fermentativo.

### **Objetivo 3: Evaluar la viabilidad y estabilidad in vitro del prototipo del inoculante biológico con base en la bacteria diazotrófica**

#### **Caracterización principio activo**

A partir de la biomasa obtenida, bajo las condiciones previamente establecidas se caracterizó el principio activo realizando las pruebas que se describen a continuación:

#### **Viabilidad**

A partir de 10ml de la biomasa obtenida, se realizaron diluciones seriadas en base 10 hasta  $10^{-8}$  en solución salina estéril 0.85% (P/V). Posteriormente se realizó el recuento en placa en agar Agrícola, utilizando la técnica de microgota, para determinar la concentración en UFC/ml de la fermentación obtenida. Este ensayo se realizó por triplicado.

#### **Recuento de contaminantes**

A partir de las diluciones seriadas provenientes de la prueba de viabilidad, se hicieron recuentos en placa en los medios de cultivo sólidos Rosa de Bengala y Topping, para hacer el recuento de hongos, levaduras y bacterias contaminantes respectivamente. Se sembraron las diluciones  $10^{-3}$  y  $10^{-4}$ , en el medio rosa de bengala, y las diluciones  $10^{-5}$  y  $10^{-6}$ , en el medio topping. Este procedimiento se llevó a cabo siguiendo el protocolo estandarizado por el laboratorio de Microbiología de Suelos de CORPOICA.

#### **Evaluación de la actividad**

##### **Fijación biológica de nitrógeno**

Se hizo el ensayo de reducción del acetileno (ARA) mediante cromatografía de gases, siguiendo el protocolo establecido por el Laboratorio de Microbiología de Suelos, para la determinación de la actividad nitrogenasa en cultivos de microorganismos diazótrofos (Valero, 2002). Los resultados de actividad enzimática de la nitrogenasa se calcularon por interpolación a partir de una curva de calibración con diluciones conocidas de etileno, relacionando la cantidad de

nanomoles de etileno (concentración conocida) con el área del pico de etileno detectada por el cromatógrafo de gases para dicha dilución (Valero, 2002). Para estos ensayos los cultivos bacterianos fueron crecidos en el medio de cultivo Ashby semisólido (libre de nitrógeno) (Eckert, 2001).

#### **Producción de compuestos indólicos:**

Se realizó utilizando la técnica colorimétrica (Salkowsky) para la producción de índoles totales. En la cual a partir de la fermentación líquida de la cepa se tomaron 4 mL de cultivo, se centrifugarán a 10.000 rpm por 10 minutos para recuperar el sobrenadante en tubos nuevos, de dichos sobrenadantes se tomará 1mL y se llevara a reacción con 1mL del reactivo de Salkowsky modificado, y se incubaron por 30minutos en completa oscuridad por triplicado. Una vez pasado el tiempo de reacción, se determinó la absorbancia de cada tubo en un espectrofotómetro a 540nm, con los datos de absorbancia se obtuvo el promedio de las replicas y se reemplazaron los datos en la ecuación de la recta de la curva patrón, para determinar la producción de índoles totales en  $\mu\text{g}/\text{mL}$  (Gallardo y Celis, 2008; Carreño *et al.*, 2000).

#### **Solubilización de fósforo in vitro:**

Se inoculó medio SRSM1 líquido con fosfato tricálcico y como fuente de fósforo inorgánico insoluble, sin indicador de pH, con la cepa AC1, el contenido de fósforo soluble, se determinó a través del método de fosfomolibdeno. Se realizó un cultivo bacteriano en caldo nutritivo, estableciendo una concentración de inóculo de  $1 \times 10^7$  células/ml por medio del método del nefelómetro de Mac Farland. De esta concentración se inoculó por triplicado 1mL a tubos con 24mL de medio SRS con fosfato tricálcico, sin indicador de pH. Los cultivos se llevaron a incubar a 30°C, con agitación continua a 150 rpm. Se realizó un control negativo utilizando tubos con 25mL de medio sin inóculo y se incubaron bajo las mismas condiciones (Valero 2003).

El ensayo tuvo una duración de 12 días al cabo de los cuales se realizó la lectura de fósforo disponible en el medio de cultivo. Las muestras fueron centrifugadas a 3000 rpm por un periodo de cinco minutos para tomar el sobrenadante. En un

tubo de vidrio, se adicionaron 8ml de agua destilada, 0.5 ml del sobrenadante obtenido a partir de las muestra, 0.5 ml del reactivo 1 (iones molibdato en solución sulfúrica) y finalmente 0.5 ml del reactivo 2 (ácido ascórbico). El espectro de absorción del producto de reacción se midió a 712 nm en espectrofotómetro GENESYS TM 10 Series, la lectura se reportó en partes por millón (ppm) de fosfato soluble, extrapolando las absorbancias a través de la curva patrón.

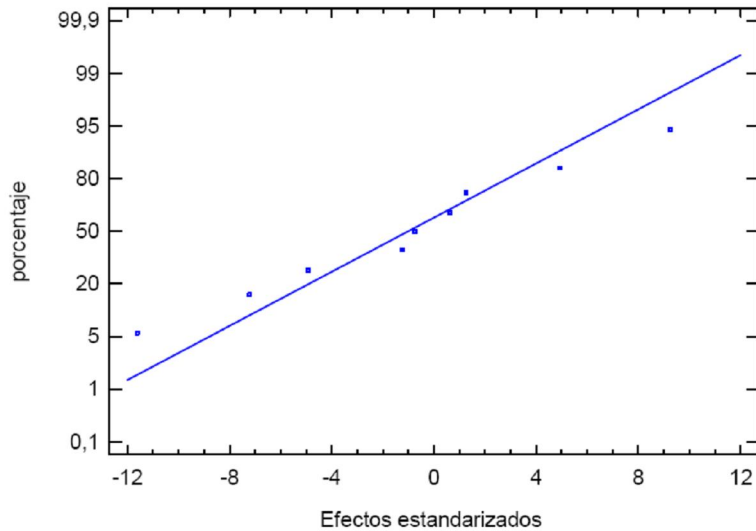
### **Pruebas de estabilidad acelerada**

El prototipo fue distribuido en frascos de polietileno estériles con un volumen de 100 mL. El cultivo bacteriano enquistado fue agregado a estos recipientes hasta alcanzar el volumen mencionado. Se evaluaron 3 temperaturas de almacenamiento ( $4\pm 2^{\circ}\text{C}$ ,  $20\pm 2^{\circ}\text{C}$  y  $30\pm 2^{\circ}\text{C}$ ) durante un periodo de 3 meses con el fin de determinar la vida útil del prototipo propuesto. Durante el tiempo de almacenamiento se evaluó la estabilidad del prototipo determinando la viabilidad celular, recuento de contaminantes y estabilidad de la actividad promotora del crecimiento vegetal, como se describió anteriormente, cada quince días durante los tres meses de evaluación.

## **RESULTADOS Y DISCUSION**

### **Determinación condiciones de fermentación**

De acuerdo con los resultados obtenidos mediante la aplicación de un diseño factorial completo de resolución V (cinco), por medio del cual se evaluaron diferentes condiciones fisicoquímicas concernientes al crecimiento de la cepa AC1 de *Azotobacter chroococcum*. El diseño factorial demostró una distribución normal (Figura 1) con una confianza del 95% y un coeficiente de correlación de 95.85% y un valor ajustado de 94.05%.



**Figura 1.** Grafico de Probabilidad Normal para la variable de respuesta evaluada para el estudio.

El diseño evaluó como tal, tres factores principales, tres interacciones duales y una interacción tripartita. Se evidenciaron efectos significativos ( $P < 0.05$ ) en las tres condiciones evaluadas individualmente, en una interacción dual y en la interacción tripartita, siendo positivas aireación y agitación (Tabla 3, Figura 2).

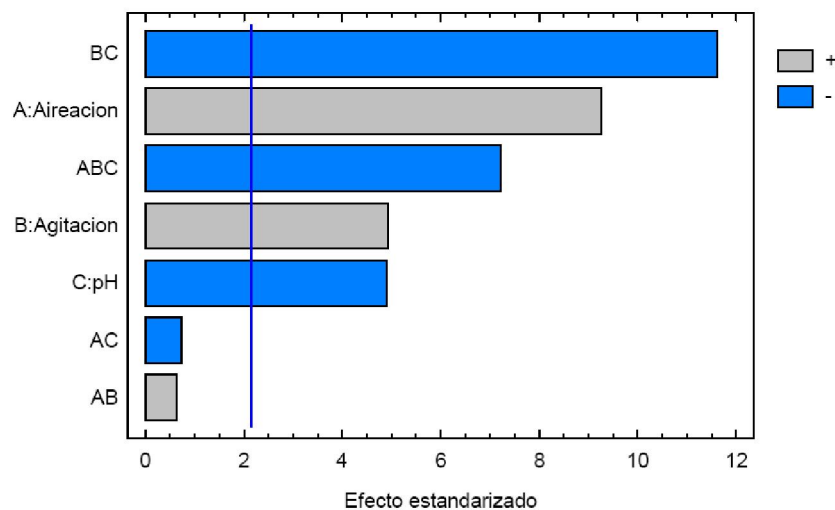
**Tabla 3.** Análisis de Varianza para UFC/mL de *Azotobacter chroococcum* AC1 en relación a factores fisicoquímicos.

<b>Factor</b>	<b>Codificación</b>	<b>P</b>	<b>Nivel alto (+1)</b>	<b>Nivel bajo (-1)</b>	<b>Razón-P</b>
AR	Aireación	0.0000	0.4 vvm	0.2 vvm	85.59
AG	Agitación	0.0002	500 rpm	300 rpm	24.25
PH	pH	0.0002	Controlado	Sin-control	24.16
AR*AG	Aireación*Agitación	0.5353	N.A	N.A	0.40
AR*PH	Aireación*pH	0.4713	N.A	N.A	0.55
AG*PH	Agitación* pH	0.0000	N.A	N.A	134.89
AR*AG*PH	Aireación*Agitación*pH	0.0000	N.A	N.A	52.15

R-cuadrado = 95.85% y R-cuadrado ajustado de 94.05%.  
N.A = No Aplica

La aireación y la agitación presentaron un efecto positivo ( $P < 0.05$ ) sobre el crecimiento del microorganismo expresado en UFC/mL, así como el control de pH

presentó un efecto negativo ( $P < 0.05$ ) sobre el crecimiento del microorganismo (Tabla 2, Figura 2) tal como lo reportan Myshkina *et al.*, (2008), Samiran *et al.*, (2009) y Thavasi *et al.*, (2009) los cuales demostraron que al someter *Azotobacter chroococcum* a rangos de pH más alcalinos (7.2 – 8.0) favorecen la multiplicación del microorganismo mientras que pH neutros (6.0 – 7.0) limitan su crecimiento. La interacción entre agitación y pH, y la combinación tripartita de los factores en evaluación, demostraron efectos negativos ( $P < 0.05$ ) sobre el crecimiento de la cepa, debido principalmente a la interacción negativa que posee el pH controlado cerca de la neutralidad.



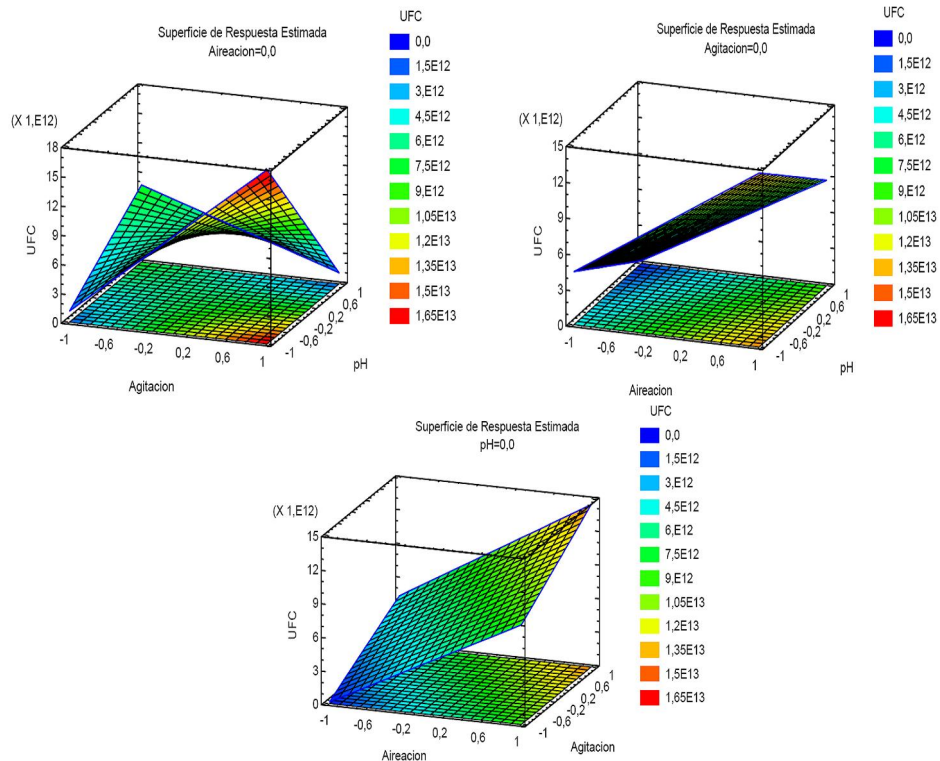
**Figura 2.** Diagrama de Pareto para condiciones de fermentación evaluadas con un alfa = 0.05.

El diseño experimental aplicado permitió determinar, las condiciones de fermentación óptimas para obtener el mejor resultado expresado en UFC/mL, así mismo expresar las correlaciones entre los factores por medio de una superficie de respuesta (Figuras 3a, b y c).

La interacción negativa para agitación y pH determinada en el diagrama de Pareto (Figura 2), se muestra en la Figura 3a, en la cual se observa, que existe una relación inversa entre la velocidad de agitación y el pH del medio de cultivo, donde el pH no controlado en el medio permite una mayor expresión en UFC/mL debido a que la fermentación con pH libre alcanzó un pH de entre 7.81 y 8.22, y obteniendo un mayor recuento celular al aumentar la velocidad de agitación. Los contornos bajo



la superficie de respuesta determinan las concentraciones de los factores óptimos que maximizan la respuesta en UFC/mL en relación a la interacción de las variables de la grafica.



**Figura 3. a.)** Superficie estimada de correlación para Agitación y pH. **b.)** Superficie estimada de correlación para Aireación y pH. **c.)** Superficie estimada de correlación para Aireación y pH.

En la Figura 3b, se evidencia una relación inversa entre la aireación y el pH, respuesta similar a la obtenida a la relación entre agitación y el pH (Figura 3a), donde al mantener el pH sin control y elevando los niveles de aireación en el fermentador se obtiene una mayor respuesta en UFC/mL, esto debido a las necesidades metabólicas de *Azotobacter chroococcum*, el cual requiere una mayor presencia de oxígeno para su óptimo crecimiento (Peña *et al.*, 2000).

La correlación positiva ( $P < 0.05$ ) demostrada por las pruebas estadísticas (Tabla 2, Figura 2) evidenciada entre la aireación y la agitación (Figura 3c) esta ligada directamente a la disponibilidad de aire y el tamaño de burbuja que genera la relación entre estos dos factores, donde a un mayor flujo de aire, mayor debe ser la

velocidad de agitación, permitiendo la dispersión del aire de entrada en burbujas más pequeñas las cuales permiten una distribución más homogénea del oxígeno dentro del medio de cultivo, así como para el microorganismo donde evidenciamos que a una mayor cantidad de oxígeno, mayor es la expresión del crecimiento en UFC/mL.

Las Figuras 3a, b y c, mostraron correlaciones entre las combinaciones de los factores que permiten la mejor expresión de la variable respuesta determinada en UFC/mL. Así mismo la concentración celular promedio obtenida fue de  $1.65 \times 10^{13}$  UFC/mL.

Las condiciones evaluadas correspondieron a aireación, velocidad de agitación y pH, evaluando cada una de estas a 2 niveles sin puntos centrales para el diseño. Con base a lo reportado por Peña *et al*, (1997) donde teniendo conocimiento que la aireación estándar a aplicar a una fermentación para el género *Azotobacter* es de 1.0 v.v.m , se quiso determinar si la aireación mínima era factor determinante sobre el crecimiento de *A. chroococcum*, con base en los resultados estadísticos y el diseño experimental aplicado expresado en las superficies de respuesta, se demostró que una aireación de 0.4 v.v.m es suficiente para suplir los requerimientos respiratorios de *Azotobacter chroococcum* AC1 y obtener rendimientos de  $1.65 \times 10^{13}$  UFC/mL en 20h de fermentación.

Así mismo mediante la aplicación de la herramienta de optimización aplicada sobre la variable de respuesta (UFC/mL) permitió determinar los niveles de los factores que según el diseño experimental optimizan la variable respuesta del estudio, así mismo plantea un valor teórico con base a los resultados obtenidos, para lo cual el valor estimado de la variable respuesta es  $2.69 \times 10^{13}$  UFC/mL. Para realizar la confirmación y aproximación al diseño descrito, se realizó una fermentación bajo las condiciones determinadas por la herramienta por triplicado y se obtuvo un rendimiento de  $1.06 \times 10^{13}$  UFC/mL (Tabla 4).

**Tabla 4.** Correlación de máxima respuesta mediante la herramienta de optimización

Factor	Factores				Respuesta	
	Codificados				(UFC/mL)	
	Bajo	Alto	Optimo	Optimo	Estimada	Obtenido
Aireación	-1	1	1	0.4 vvm		
Agitación	-1	1	1	500 rpm	2.69x10 <sup>13</sup>	1.06x10 <sup>13</sup>
pH	-1	1	-1	Sin control		

### Enquistamiento de la cepa AC1:

La adición de los inductores de enquistamiento evaluados, AE01 y AE02, demostró la capacidad de la cepa AC1 para formar quistes bajo condiciones de estrés.

**Tabla 5.** Porcentaje de enquistamiento obtenido en cada uno de los tratamientos evaluados.

Tratamiento	Concentración inicial (UFC/mL)	Porcentaje enquistamiento (%)	Concentración final (UFC/mL)
1	1.0X10 <sup>10</sup>	0.0	3.2X10 <sup>3</sup>
2	1.6X10 <sup>10</sup>	53.0 <sup>b</sup>	8.0X10 <sup>9</sup>
3	2.2X10 <sup>10</sup>	67.0 <sup>a</sup>	1.0X10 <sup>10</sup>
4	9.0X10 <sup>9</sup>	62.0 <sup>b</sup>	5.0X10 <sup>9</sup>
5	2.1X10 <sup>10</sup>	35.0 <sup>c</sup>	7.0X10 <sup>9</sup>
6	4.0X10 <sup>9</sup>	38.0 <sup>c</sup>	1.0X10 <sup>9</sup>
7	1.5X10 <sup>10</sup>	33.0 <sup>c</sup>	4.0X10 <sup>9</sup>

En la tabla 5 se puede observar los distintos porcentajes de enquistamiento obtenidos en la evaluación de los dos inductores utilizados (AE01 y AE02). Los resultados evidencian que ambos inductores son capaces de disparar el proceso de enquistamiento de las células de *Azotobacter chroococcum*, bajo condiciones de fermentación sumergida en medio MBR.

El tratamiento 3 fue el que presentó un mayor porcentaje de enquistamiento, alrededor de 67%, correspondiente al agente AE01 adicionado en una concentración igual al 0.7%. También se puede observar que el agente AE02 es

capaz de inducir la formación de quistes de las células vegetativas de la cepas AC1, sin embargo, al compararse con los resultados obtenidos por el agente AE01, los porcentajes de enquistamiento obtenidos corresponden a la mitad de los obtenidos por el agente AE01. Con este agente solamente fueron capaces de formar quistes, alrededor de un 35.3% de las células presentes.

Los lípidos poli- $\beta$ -hidroxibutirato (PHB) y alkylresorcinoles son los principales productos metabólicos de quistes en especies de *Azotobacter*. Los quistes se forman cuando las células vegetativas están en contacto con sustancias como sacarosa, n-butanol o  $\beta$ -hidroxibutirato, de forma general estas formas de resistencia aparecen en la fase estacionaria de crecimiento, cuando son adicionadas sustancias como las anteriormente nombradas (REFERENCIA).

Lin y Sadoff (1968) utilizaron sacarosa al 0.01%, adicionada en la fase estacionaria de un cultivo de *Azotobacter vinelandii*, y observaron que después de la inducción de enquistamiento, se produce una rápida formación de gránulos de PHB y posteriormente las células comienzan la síntesis de alkylresorcinoles que sustituyen a los fosfolípidos en las membranas y son componentes de la exina (Reusch y Sadoff 1981), que es la capa externa que se encuentra sobre el quiste. Las células vegetativas no son capaces de sintetizar alkylresorcinoles, razón por la cual no pueden producir formas enquistadas.

Sin embargo, (Lin y Sadoff 1968) determinan que al quitar la glucosa o la sacarosa de la fase exponencial de los cultivos, y sustituirlas por n-butanol o  $\beta$ -hidroxibutirato se puede inducir el enquistamiento. Esto da lugar a la inducción en la acumulación de PHB y la síntesis de alkylresorcinoles. Los gránulos de PHB pueden ser utilizados como fuente de carbono y energía, en virtud de la limitación de carbono, para que las células puedan formar los quistes (Stevenson y Sokolofsky 1966; Wyss et al. 1969; Sadoff 1975).

En contraste en la figura 4 se puede observar los cambios morfológicos celulares de la cepa AC1 (*Azotobacter chroococcum*) al utilizar o no los agentes de enquistamiento evaluados, lo que indica que los agentes de enquistamiento AE01 y AE02 indujeron la formación de polimorfos de esta cepa bacteriana. García-Esquivel (2009) reportaron, al igual que este estudio, que las características

celulares de las poblaciones que crecieron sin la influencia de los agentes de enquistamiento presentaron una morfología típica de la especie, células ovoides ( $1\mu\text{m}$  de diámetro) de forma bacilar ( $1\mu\text{m}$  de ancho X  $4.5\mu\text{m}$  de largo) sin gránulos de PHB que reaccionaron de forma negativa a la coloración de Gram (Copeland et al. 2006).

En su estudio García-Esquivel (2009) obtuvo con la adición de sacarosa (como inductor de enquistamiento) un 64.7% de quistes maduros resistentes a la desecación, estos resultados son comparables con los obtenidos en este estudio en donde el mayor porcentaje de enquistamiento fue obtenido por el inductor AE01, obteniendo 67% de quistes maduros resistentes al fenómeno de la desecación. Esta proporción de quistes maduros es similar a la obtenida por Reusch y Sadoff (1981). Varias investigaciones han establecido que sustancias, como los alcoholes, pueden inducir procesos de enquistamiento en varias especies del género *Azotobacter*, y que los alcoholes son intermediarios en el catabolismo de hidrocarburos (Watkinson y Morgan, 1990). Las características de las células vegetativas y de las células quísticas (Figura 4) corresponden a lo enunciado por otros autores que indujeron el enquistamiento de células de *Azotobacter* (Segura et al. 2003; Pal et al. 1997)

Los quistes maduros (Figura 4) se componen de un cuerpo central que consiste en el protoplasma, una membrana celular, una pared celular delgada, y el centro de los gránulos de PHB, rodeado por una capa con la típica estructura capsular que poseen las células quísticas del género *Azotobacter* (Garrity et al. 2005).

### **Caracterización principio activo**

Una vez optimizados todos los parámetros para la fermentación de AC1 en el medio de cultivo MBR, se caracterizó microbiológicamente el producto de fermentación (biomasa AC1).

Los resultados demuestran que la concentración celular de *Azotobacter chroococcum* después de 24 horas de fermentación está en el rango de  $1 \times 10^{13}$  UFC/mL, no hay presencia de microorganismos contaminantes de ningún tipo. Además, la actividad biológica de la cepa no se vio disminuida por las condiciones

de crecimiento y enquistamiento suministradas para la obtención del principio activo. Los resultados de esta caracterización se pueden ver en la tabla 6.

**Tabla 6.** Resultados de la caracterización del producto de la fermentación de la cepa AC1 en el medio de cultivo MBR, comparados frente a la NTC 349/07

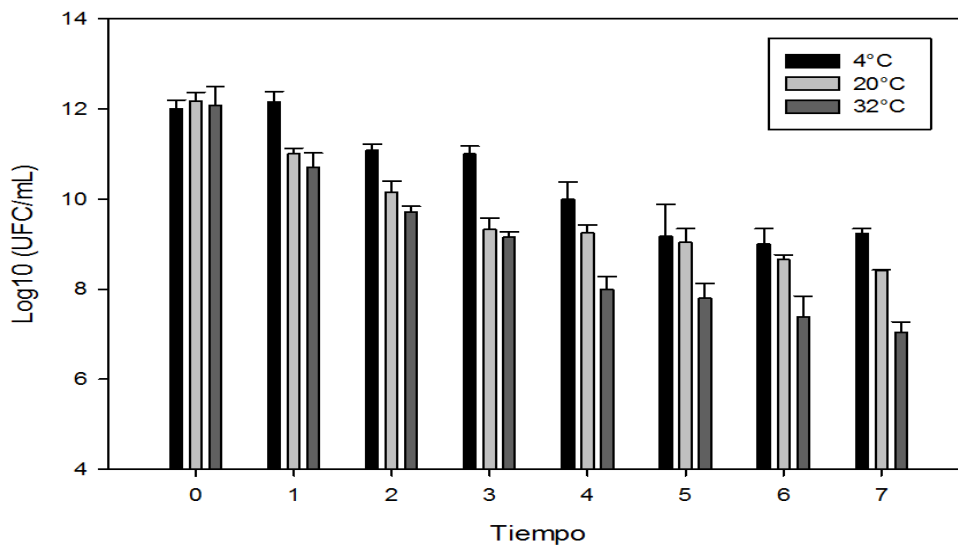
Parámetro	Resultado	Optimo según NTC para Bioinoculantes*	
Concentración celular	1.06X10 <sup>13</sup> UCF/mL	Mínimo 1X10 <sup>7</sup> UFC/g o mL	
Porcentaje de pureza	99%	95%	
Actividad	ARA	68.01nmol C <sub>2</sub> H <sub>4</sub> /mL/h	
	Índoles Totales	16.50µgAIA/mL	No determinado por la norma
	P disponible	115.4mg P <sub>2</sub> O <sub>5</sub> /ml	

\*NTC 349/07 (Proyecto de Norma Técnica). Valores mínimos aprobados para certificar productos de calidad

### Estabilidad del principio activo

Las pruebas de estabilidad de biofertilizantes ayudan a determinar la vida útil de los mismos, así como, el comportamiento de la actividad biológica a través del tiempo. Durante los 105 días de evaluación (aproximadamente 3 meses) se evaluó la viabilidad y la actividad biológica (fijación biológica de nitrógeno, solubilización de fosfatos y producción de sustancias indolicas) de la cepa AC1 en estado de enquistamiento.

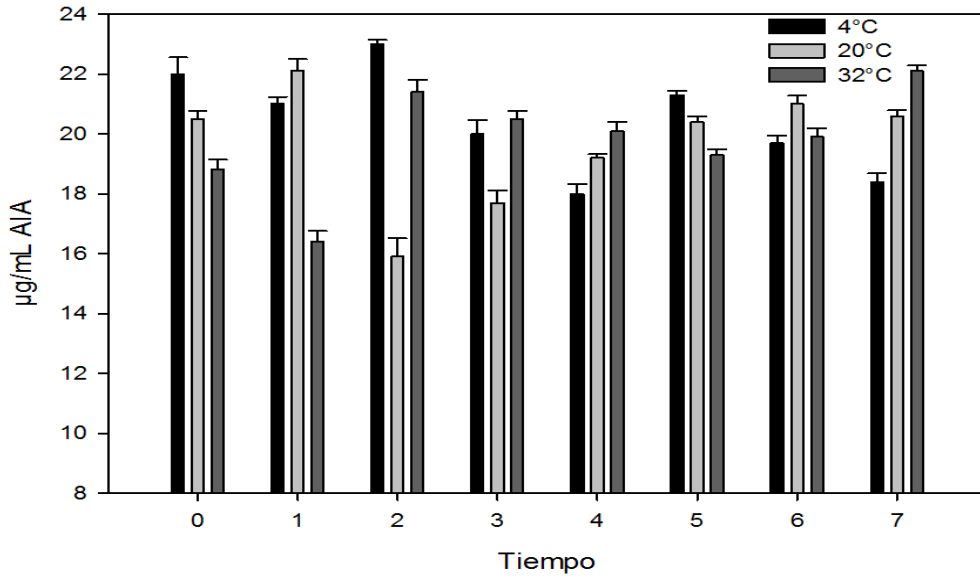
En la figura 4 se puede observar el comportamiento de la viabilidad de la cepa en estado de enquistamiento, en las tres temperaturas evaluadas. Al finalizar el tiempo de evaluación (105 días) fue posible encontrar que la disminución en la concentración bacteriana nunca estuvo por debajo del orden de 10<sup>8</sup> UFC/mL, en las tres temperaturas de almacenamiento. También es posible determinar que en condiciones de refrigeración (4°C) la concentración final obtenida estuvo alrededor de 1X10<sup>9</sup> UFC/mL, siendo la mejor temperatura para el almacenamiento de la cepas en condiciones de enquistamiento.



**Figura 4.** Viabilidad de la cepa AC1 después del enquistamiento durante 105 días de evaluación bajo tres temperaturas de almacenamiento

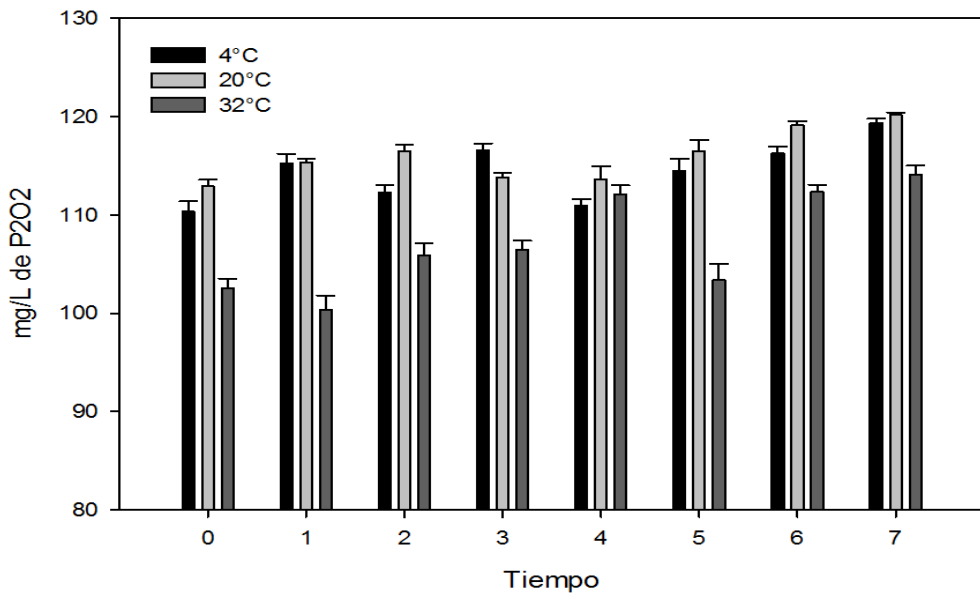
La actividad biológica es uno de los principales componentes que debe ser tenido en cuenta al momento de realizar pruebas de estabilidad, ya que es el verdadero indicativo para conocer el estado de la cepa después de un proceso de almacenamiento por un periodo de tiempo prolongado. La cepa AC1 se ha caracterizado por ser capaz de producir sustancias tipo indol y esta característica fue medida a través del tiempo y en las temperaturas de evaluación.

La síntesis de indoles se presentó indiscriminadamente en todos los tratamientos durante los 105 días de almacenamiento en un rango que varió entre 16µg de AIA/mL y 23µg de AIA/mL (Figura 5).



**Figura 5.** Producción de indoles totales por parte de la cepa AC1 después del enquistamiento durante 105 días de evaluación bajo tres temperaturas de almacenamiento

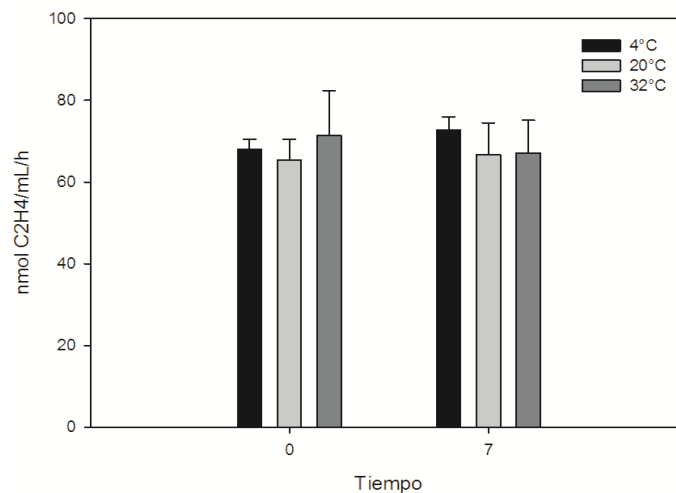
Igualmente en la figura 6, se puede observar la cantidad de fósforo disponible producido por la cepa AC1 en estado de enquistamiento. El comportamiento general de esta actividad en todos los tratamientos fue en aumento a través del tiempo, obteniéndose un máximo de fósforo disponible de 120 mg de P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>/mL





**Figura 6.** Producción de fósforo disponible por parte de la cepa AC1 después del enquistamiento durante 105 días de evaluación bajo tres temperaturas de almacenamiento

En cuanto a la actividad fijadora de nitrógeno se realizó un ensayo de reducción de acetileno, para determinar la actividad de la enzima nitrogenasa de la cepa AC1 de *Azotobacter chroococcum*. Se obtuvo que al comparar el tiempo 0 con el tiempo siete, después de 105 días de evaluación, no se presentaron diferencias significativas en los tratamientos evaluados (Figura7). En promedio la actividad de la nitrogenasa registro un valor de 70 nmol C<sub>2</sub>H<sub>4</sub>/mL/h.



**Figura 7.** Actividad de la enzima nitrogenasa por parte de la cepa AC1 después del enquistamiento en el tiempo cero y a los 105 días de evaluación bajo tres temperaturas de almacenamiento

### Análisis económico

Después de evaluar la estabilidad de la cepa AC1 en estado de enquistamiento, fue necesario comparar los costos del sistema de producción propuesto, para la obtención de un posible biofertilizante en presentación líquida frente a la formulación sólida existente (MONIBAC®). En la tabla 7 se muestra una comparación de los costos de producción de una unidad de biofertilizante en cada uno de los procesos, en donde se presenta que existe una reducción del 44.6% en los costos de producción al implementar la producción de la cepa AC1 en estado de enquistamiento.

**Tabla 7.** Análisis comparativo de costos de producción biofertilizante MONIBAC y AC1 en presentación líquida.

<b>Proceso</b>	<b>Costos de producción / unidad</b>	<b>Posible valor comercial</b>	<b>Reducción</b>
MONIBAC	\$ 9.489	\$ 23.722	
AC1 presentación líquida	\$ 5.279	\$ 13.197	44.6%

## **CONCLUSIONES**

*Azotobacter chroococcum* es capaz de ser enquistado en el medio de cultivo MBR bajo condiciones de biorreactor. Después de 105 días de evaluación se demostró que la cepa AC1 es capaz de mantener su viabilidad y actividad biológica, sin importar la temperatura de almacenamiento

## BIBLIOGRAFÍA

1. **BACA, B., SOTO, L. & PARDO, M.** 2000. Fijación biológica de nitrógeno. Elementos. 1: 39 – 49.
2. **BARTON. L. L.** 2005. Structural and Functional Relationships in Prokaryotes. Editorial Springer. New York, E.E.U.U. 820 p.
3. **BONILLA, R., MORALES, J.** 2005. Monibac biofertilizante con base en cepas nativas de *Azobacter* sp. para incrementar la productividad y sostenibilidad del algodónero. En: Colombia Innovación Y Cambio Tecnológico - Corpoica ISSN: 1657-0901 ed: Productos Editoriales y Audiovisuales Produmedios v.4 fasc. p.30 – 34.
4. **BONILLA, R., MURILLO, J.** 1992. Desarrollo de sistemas de manejo para la recuperación de suelos compactados de los departamentos de la Guajira, Cesar y Magdalena. En: (Romero, Aristizabal, Jaramillo, ed). Memorias Encuentro nacional de labranza de conservación. Villavicencio. P 195-216.
5. **BONILLA, R., MURILLO, J., GNECCO, M., VALERA, L., OROZCO, G.** 2002. Mejoramiento y conservación de suelos algodóneros: Técnicas de labranza e Incorporación de abonos verdes. En: Colombia Innovación Y Cambio Tecnológico - Corpoica ISSN: 1657-0901 ed: Productos Editoriales y Audiovisuales-Produmedios v.2 fasc. p.53-59.
6. **BONILLA, R., NOVO, R.** 1998. "Distribución nivel poblacional de bacterias diazotróficas del género *Azotobacter* sp, en suelos de los departamentos del Cesar, Córdoba y Guajira". En: Colombia Corpocaribe ISSN:0 ed: v.1 fasc. p.45 – 52.
7. **CAMPOS, MARIA EUGENIA; MARTINEZ-SALAZAR, JAIME M; LLORET, LOURDES; MORENO, SOLEDAD; NUÑEZ, CINTHIA; ESPIN, GUADALUPE; SOBERON-SANCHEZ, GLORIA.** 1996. Characterization of the gene coding for GDP-mannose dehydrogenase (*algD*) from *Azotobacter vinelandii*. Journal of Bacteriology. Vol 178, No. 7 p. 1793-1799.

8. **CARDENAS. M.** 2007. Aislamiento y caracterización de cepas de *Azospirillum* sp., con potencial biofertilizante en pasto Guinea (*Panicum maximum* Jacq) del valle del Cesar. Tesis de Maestría. ISBN: 978-958-44-2911-7. Ed. Produmedios, Bogota-Colombia.
9. **Carreno-Lopez, R., N. Campos-Reales, C. Elmerich, and B. E. Baca.** 2000. Physiological evidence for differently regulated tryptophan-dependent pathways for indole-3-acetic acid synthesis in *Azospirillum brasilense*. *Mol Gen Genet* **264**:521-30.
10. **COPELAND L, FENG L, TABRETT C.** 2006. Polyhydroxybutyrate in nitrogen-Wxing symbioses. In: Pedrosa FO (ed) Nitrogen Wxation: from molecules to crop productivity. Kluwer Academic Publishers, Netherlands, pp 377–378
11. **CUESTA, P.** 2005. Manual Técnico. Producción y utilización de recursos forrajeros en sistemas de producción bovina de las regiones Caribe y Valles interandinos. Colombia: Arteprint Ltda. ISBN 958-8210-79-8. 97 pp.
12. **ECKERT, B., BALLER, O., KIRCHHOF, G., HALBRITTER, A., STOFFELS, M. AND HARTMANN, A.** 2001. *Azospirillum doebereinae* sp. nov., a nitrogenfixing bacterium associated with the C4-grass *Miscanthus*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 51: 17-26.
13. **ESPÍN G.** 2007. Biología de *Azotobacter vinelandii*. Micro-bios. *Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México*. 1-17p.
14. **GARCIA-ESQUIVEL, GABRIELA; CALVA-CALVA, GRACIANO; FERRERA-CERRATO, RONALD.** 2009. Encysment of *Azotobacter nigricans* grown diazotrophically on kerosene as sole carbon source. *Arch. Microbiol.* 191:275-281
15. **GARRITY MG, BELL AJ, LILBURN T.** 2005. Order IX Pseudomonadales Orla-Jensen 1921, 270 AL. In: Garrity MG (ed) *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology Part two. The Proteobacteria*, 2nd edn. Springer, USA, pp 384–402.

16. **LIN, L.P; SADOFF, H.L.** 1968. Encystment and polymer production by *Azotobacter vinelandii* in the presence of  $\beta$ -hydroxybutyrate. Journal of Bacteriology. Vol 95, No. 6 p. 2336-2343.
17. **MAHECHA, L.** 2002. El silvopastoreo: una alternativa de producción que disminuye el impacto ambiental de la ganadería bovina. Revista Colombiana de Ciencia Pecuaria. 15(2): 226-231.
18. **MARÍN, V. A.; BALDANI, V.L., DOS SANTOS, R.; BALDANI, I. J.** 2003. Fixação biológica de nitrogênio de nitrogênio; bacterias fixadoras de nitrogênio de importância para a agricultura tropical. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. 44 p. (Comunicado Técnico).
19. **MYSHKINA V. L., NIKOLAEVA D. A., MAKHINA T. K., BONARTSEV A. P., & BONARTSEVA G. A.** 2008. Effect of Growth Conditions on the Molecular Weight of Poly-3-hydroxybutyrate Produced by *Azotobacter chroococcum* 7B. Applied Biochemistry and Microbiology, 2008, Vol. 44, No. 5, pp. 482–486p.
20. **NEWTON, W. FISHER K.** 2002. Nitrogen Fixation – A General Overview in Nitrogen Fixation at the Millennium. G. Jeffery Leigh, Editor. Elsevier Publications. p. 1-34.
21. **PAL S, MANNA ANUPMAN, AMAL KP.** 1997. Induction of encystment and poly- $\beta$ -hydroxybutyric acid production by *Azotobacter chroococcum* MAL-201. Curr Microbiol 35:327–330.
22. **Peña, C., M. A. Trujillo-Roldán, and E. Galindo.** 2000. Influence of dissolved oxygen tension and agitation speed on alginate production and its molecular weight in cultures of *Azotobacter vinelandii* [small star, filled]. Enzyme and Microbial Technology **27**:390-398.
23. **Peña, C., M. Millan, and E. Galindo.** 2008. Production of alginate by *Azotobacter vinelandii* in a stirred fermentor simulating the evolution of power input observed in shake flasks. Process Biochemistry **43**:775-778.

24. **REUSCH, R.N; SADOFF, H.L.** 1981. Lipid metabolism during encystment of *Azotobacter vinelandii*. Journal of Bacteriology. Vol 145, No. 2 p. 889-895
25. **SADOFF, H.L.** 1975. Encystment and germination in *Azotobacter vinelandii*. Bacteriological Reviews. Vol 39, No. 4 p. 516-539.
26. **SEGURA D, CRUZ T, ESPÍN G.** 2003. Encystment and alkylresorcinol production by *Azotobacter vinelandii* strains impaired in polyhydroxybutyrate synthesis. Arch Microbiol 179:437–443.
27. **STEENHOUDT. O, VANDERLEYDEN. J.** 2000. *Azospirillum* a free living nitrogen fixing bacterium closely associated with grasses: genetic, biochemical and ecological aspects. FEMS Microbiology Reviews 24: 487-506
28. **STEVENSON LH, SOCOLOFSKY MD.** 1972. Encystment of *Azotobacter vinelandii* in liquid culture. Antonie van Leeuwenhoek 38:605–616.
29. **SYLVIA, D., HARTEL, P., FUHRMANN, J., ZUBERER, D.** 2005. *Principles and Applications of Soil Microbiology*. Segunda Edición. Editorial Prentice Hall. New Jersey, E.E.U.U. 644 p.
30. **TEJERA N., LLUCH C., MARTÍNEZ-TOLEDO M.V. & GONZÁLEZ-LÓPEZ J.** 2005. Isolation and characterization of *Azotobacter* and *Azospirillum* strains from the sugarcane rhizosphere. *Plant and Soil* 270: 223–232p.
31. **THAVASI V. R. M., SUBRAMANYAM NAMBARU., JAYALAKSHMI T., BALASUBRAMANIAN & IBRAHIM M. BANAT.** 2009. Biosurfactant Production by *Azotobacter chroococcum* Isolated from the Marine Environment. *Mar Biotechnol* (2009) 11:551–556p.
32. **VALERO, N.** 2002. Potencial biofertilizante de bacterias diazotróficas y solubilizadoras de 97 fosfatos asociadas al cultivo de arroz (*Oryza sativa* L.). Universidad Nacional de Colombia. Maestría Interfacultades en Microbiología. Bogotá, D.C.
33. **VALERO, N.** 2003. Potencial biofertilizante de bacterias diazotófas y solubilizadoras de fosfato asociadas al cultivo de arroz. (*Oriza sativa*. L).

Tesis Magíster en Microbiología. Universidad Nacional de Colombia. Bogotá.  
120p

34. **WATKINSON RJ, MORGAN P.** 1990. Physiology of aliphatic hydrocarbondegrading microorganisms. *Biodegradation* 1:79–92.
35. **WYSS O, NEWMANN MG, SOCOLOFSKY MD.** 1961. Development and germination of the *Azotobacter* cyst. *J Biophys Biochem Cytol* 10:555–565.

## ANEXOS

### Diseño empleado para optimización de condiciones de fermentación

#### Screening Design Attributes

Design class: Screening

Design name: Factorial 2<sup>3</sup>

File name: C:\Documents and Settings\mcamelo\Mis documentos\Mauricio Personal\Memoria docs\MFactorial 2<sup>3</sup>

#### **Base Design**

Number of experimental factors: 3

Number of blocks: 3

Number of responses: 1

Number of runs: 24

Error degrees of freedom: 16

Randomized: Yes

<i>Factors</i>	<i>Low</i>	<i>High</i>	<i>Units</i>	<i>Continuous</i>
Aireacion	-1,0	1,0	l.p.m	Yes
Agitacion	-1,0	1,0	r.p.m	Yes
pH	-1,0	1,0		Yes

<i>Responses</i>	<i>Units</i>
UFC	UFC/ml

#### **The StatAdvisor**

You have created a Factorial design which will study the effects of 3 factors in 24 runs. The design is to be run in 3 blocks. The order of the experiments has been fully randomized. This will provide protection against the effects of lurking variables.

NOTE: if you have used Augment Design to add a fraction to a fractional factorial design, you should check the Alias Pattern using Tabular Options. If unusual confounding exists, the number of degrees of freedom for estimating experimental error may be larger than shown in the summary.



### Analyze Experiment - UFC

File name: C:\Documents and Settings\mcamelo\Mis documentos\Mauricio Personal\Memoria docs\MFactorial 2^3

#### Estimated effects for UFC (UFC/ml)

Effect	Estimate	Std. Error	V.I.F.
average	7,00948E12	5,05831E11	
A:Aireacion	9,35913E12	1,01166E12	1,0
B:Agitacion	4,9819E12	1,01166E12	1,0
C:pH	-4,97287E12	1,01166E12	1,0
AB	6,42955E11	1,01166E12	1,0
AC	-7,48945E11	1,01166E12	1,0
BC	-1,17496E13	1,01166E12	1,0
ABC	-7,30564E12	1,01166E12	1,0
block	1,7884E12	1,43071E12	1,33333
block	-1,78698E12	1,43071E12	1,33333

Standard errors are based on total error with 14 d.f.

#### The StatAdvisor

This table shows each of the estimated effects and interactions. Also shown is the standard error of each of the effects, which measures their sampling error. Note also that the largest variance inflation factor (V.I.F.) equals 1,33333. For a perfectly orthogonal design, all of the factors would equal 1. Factors of 10 or larger are usually interpreted as indicating serious confounding amongst the effects.

To plot the estimates in decreasing order of importance, select Pareto Charts from the list of Graphical Options. To test the statistical significance of the effects, select ANOVA Table from the list of Tabular Options. You can then remove insignificant effects by pressing the alternate mouse button, selecting Analysis Options, and pressing the Exclude button.

**Analysis of Variance for UFC**

<i>Source</i>	<i>Sum of Squares</i>	<i>Df</i>	<i>Mean Square</i>	<i>F-Ratio</i>	<i>P-Value</i>
A:Aireacion	5,2556E26	1	5,2556E26	85,59	0,0000
B:Agitacion	1,48916E26	1	1,48916E26	24,25	0,0002
C:pH	1,48377E26	1	1,48377E26	24,16	0,0002
AB	2,48035E24	1	2,48035E24	0,40	0,5353
AC	3,36551E24	1	3,36551E24	0,55	0,4713
BC	8,2832E26	1	8,2832E26	134,89	0,0000
ABC	3,20234E26	1	3,20234E26	52,15	0,0000
blocks	1,27833E25	2	6,39167E24	1,04	0,3789
Total error	8,59706E25	14	6,14076E24		
Total (corr.)	2,07601E27	23			

R-squared = 95,8588 percent

R-squared (adjusted for d.f.) = 93,1967 percent

Standard Error of Est. = 2,47806E12

Mean absolute error = 1,49764E12

Durbin-Watson statistic = 1,98993 (P=0,3599)

Lag 1 residual autocorrelation = -0,00421489

**The StatAdvisor**

The ANOVA table partitions the variability in UFC into separate pieces for each of the effects. It then tests the statistical significance of each effect by comparing the mean square against an estimate of the experimental error. In this case, 5 effects have P-values less than 0,05, indicating that they are significantly different from zero at the 95,0% confidence level.

The R-Squared statistic indicates that the model as fitted explains 95,8588% of the variability in UFC. The adjusted R-squared statistic, which is more suitable for comparing models with different numbers of independent variables, is 93,1967%. The standard error of the estimate shows the standard deviation of the residuals to be 2,47806E12. The mean absolute error (MAE) of 1,49764E12 is the average value of the residuals. The Durbin-Watson (DW) statistic tests the residuals to determine if there is any significant correlation based on the order in which they occur in your data file. Since the P-value is greater than 5,0%, there is no indication of serial autocorrelation in the residuals at the 5,0% significance level.

**Regression coeffs. for UFC**

<i>Coefficient</i>	<i>Estimate</i>
constant	7,00948E12
A:Aireacion	4,67956E12
B:Agitacion	2,49095E12
C:pH	-2,48644E12
AB	3,21478E11
AC	-3,74472E11
BC	-5,87481E12
ABC	-3,65282E12

**The StatAdvisor**

This pane displays the regression equation which has been fitted to the data. The equation of the fitted model is

$$\text{UFC} = 7,00948\text{E}12 + 4,67956\text{E}12 \cdot \text{Aireacion} + 2,49095\text{E}12 \cdot \text{Agitacion} - 2,48644\text{E}12 \cdot \text{pH} + 3,21478\text{E}11 \cdot \text{Aireacion} \cdot \text{Agitacion} - 3,74472\text{E}11 \cdot \text{Aireacion} \cdot \text{pH} - 5,87481\text{E}12 \cdot \text{Agitacion} \cdot \text{pH} - 3,65282\text{E}12 \cdot \text{Aireacion} \cdot \text{Agitacion} \cdot \text{pH}$$

where the values of the variables are specified in their original units. To have STATGRAPHICS evaluate this function, select Predictions from the list of Tabular Options. To plot the function, select Response Plots from the list of Graphical Options.

### Correlation Matrix for Estimated Effects

		(1)	(2)	(3)	(4)	(5)	(6)	(7)	(8)	(9)	(10)
(1)	average	1,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000
(2)	A:Aireacion	0,0000	1,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000
(3)	B:Agitacion	0,0000	0,0000	1,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000
(4)	C:pH	0,0000	0,0000	0,0000	1,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000
(5)	AB	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	1,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000
(6)	AC	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	1,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000
(7)	BC	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	1,0000	0,0000	0,0000	0,0000
(8)	ABC	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	1,0000	0,0000	0,0000
(9)	block	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	1,0000	-0,5000
(10)	block	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	-0,5000	1,0000

#### The StatAdvisor

The correlation matrix shows the extent of the confounding amongst the effects. A perfectly orthogonal design will show a diagonal matrix with 1's on the diagonal and 0's off the diagonal. Any non-zero terms off the diagonal imply that the estimates of the effects corresponding to that row and column will be correlated. In this case, there is 1 pair of effects with a non-zero correlation. Since one or more of the pairs is greater than or equal to 0,5, you may have some difficulty separating the effects from each other when analyzing the data. You should consider adding additional runs to the design to reduce the correlations.

**Estimation Results for UFC**

	<i>Observed</i>	<i>Fitted</i>	<i>Lower 95,0% CL</i>	<i>Upper 95,0% CL</i>
<i>Row</i>	<i>Value</i>	<i>Value</i>	<i>for Mean</i>	<i>for Mean</i>
1	5,E10	4,97025E10	-3,38106E12	3,48046E12
2	3,088E11	2,69753E11	-3,16101E12	3,70051E12
3	1,7E11	1,64719E11	-3,26604E12	3,59548E12
4	7,375E12	8,83262E12	5,40186E12	1,22634E13
5	1,45E13	1,55426E13	1,21119E13	1,89734E13
6	2,7E13	2,68893E13	2,34585E13	3,032E13
7	1,663E11	2,11222E12	-1,31854E12	5,54298E12
8	6,5E12	2,20918E12	-1,22158E12	5,63994E12
9	5,125E10	9,44619E11	-2,48614E12	4,37538E12
10	2,713E11	1,16467E12	-2,26609E12	4,59543E12
11	1,575E11	1,05964E12	-2,37113E12	4,4904E12
12	7,875E12	9,72754E12	6,29677E12	1,31583E13
13	1,813E13	1,64375E13	1,30068E13	1,98683E13
14	3,067E13	2,77842E13	2,43534E13	3,1215E13
15	6,E12	3,00714E12	-4,23626E11	6,4379E12
16	7,438E10	3,1041E12	-3,26663E11	6,53486E12
17	5,E10	-8,43071E11	-4,27383E12	2,58769E12
18	2,313E11	-6,23021E11	-4,05378E12	2,80774E12
19	1,688E11	-7,28055E11	-4,15882E12	2,70271E12
20	1,125E13	7,93985E12	4,50908E12	1,13706E13
21	1,4E13	1,46498E13	1,12191E13	1,80806E13
22	2,3E13	2,59965E13	2,25658E13	2,94273E13
23	1,725E11	1,21945E12	-2,21132E12	4,65021E12
24	5,531E10	1,31641E12	-2,11435E12	4,74717E12

**The StatAdvisor**

This table contains information about values of UFC generated using the fitted model. The table includes:

- (1) the observed value of UFC (if any)
- (2) the predicted value of UFC using the fitted model
- (3) 95,0% confidence limits for the mean response

Each item corresponds to the values of the experimental factors in a specific row of your data file. To generate forecasts for additional combinations of the factors, add additional rows to the bottom of your data file. In each new row, enter values for the experimental factors but leave the cell for the response empty. When you return to this pane, forecasts will be added to the table for the new rows, but the model will be unaffected.

**Path of Steepest Ascent for UFC**

			<i>Predicted</i>
<i>Aireacion</i>	<i>Agitacion</i>	<i>pH</i>	<i>UFC</i>
<i>(l.p.m)</i>	<i>(r.p.m)</i>		<i>(UFC/ml)</i>
0,0	0,0	0,0	7,00948E12
1,0	0,989507	-0,991811	2,66599E13
2,0	2,34469	-2,34918	1,03916E14
3,0	3,57541	-3,5812	2,61867E14
4,0	4,72539	-4,73209	5,20517E14
5,0	5,83075	-5,83814	9,01457E14

**The StatAdvisor**

This pane displays the path of steepest ascent (or descent). This is the path from the center of the current experimental region along which the estimated response changes most quickly for the smallest change in the experimental factors. It indicates good locations to run additional experiments if your goal is to increase or decrease UFC. Currently, 6 points have been generated by changing Aireacion in increments of 1,0 l.p.m. You can specify the amount to change any one factor by pressing the alternate mouse button and selecting Pane Options. STATGRAPHICS will then determine how much all the other factors have to change to stay on the path of steepest ascent. The program also computes the estimated UFC at each of the points along the path, which you can compare to your results if you run those points.

### Optimize Response

Goal: maximize UFC

Optimum value = 2,689E13

<i>Factor</i>	<i>Low</i>	<i>High</i>	<i>Optimum</i>
Aireacion	-1,0	1,0	1,0
Agitacion	-1,0	1,0	1,0
pH	-1,0	1,0	-1,0

### The StatAdvisor

This table shows the combination of factor levels which maximizes UFC over the indicated region. Use the Analysis Options dialog box to indicate the region over which the optimization is to be performed. You may set the value of one or more factors to a constant by setting the low and high limits to that value.