UNIVERSIDAD NACIONAL DE INGENIERÍA

FACULTAD DE INGENIERÍA QUÍMICA

Formulación de un medio de cultivo químicamente definido para la bacteria fijadora de Nitrógeno *Azotobacter chroococcum* en el periodo Junio-Diciembre 2022

TRABAJO DE DIPLOMA PRESENTADO POR:

- **Br Ana Julia López Aguilera**
- **Br Yamil Osman Traña Somarriba**

PARA OPTAR AL TITULO DE:

INGENIERO QUÍMICO

TUTOR

MSc. Ing. Zoraya Pérez Zelaya

Managua, Nicaragua

Septiembre 2023

Agradecimientos

Es nuestro más sincero deseo incluir en esta tesis a las siguientes personas:

A nuestra Tutora Msc Ing. Zoraya Pérez Zelaya: a quien hacemos llegar nuestros más sinceros agradecimientos por permitirnos ser partícipes de uno de sus proyectos dentro de la Universidad y por su entrega incondicional, su esfuerzo y su dedicación, ya que sus conocimientos, su persistencia, su paciencia y su motivación han sido fundamentales para nuestra formación como investigadores.

Al responsable del Laboratorio de Alimentos Lic. Alejandro Celestino Hernández: ya que él ha inculcado en nosotros un sentido de seriedad, responsabilidad y rigor académico sin los cuales no podríamos tener una formación completa como investigadores.

Al Laboratorio PIENSA (Programa de Investigación Estudios Nacionales y Servicios Ambientales): Por todo el apoyo brindado en el préstamo de equipos, utilización de instalaciones y su personal de calidad durante la realización de la tesis.

Ana Julia López y Yamil O. Traña

Dedicatoria

A Dios por darnos vida, tiempo y ayuda durante todo el proceso de aprendizaje.

A Nuestros Padres que han sabido formarnos con buenos sentimientos, hábitos y valores además de habernos dado su dedicación y paciencia.

A Nuestros profesores por darnos la formación profesional con calidad y así permitirnos lograr dar un paso más el éxito.

Ana Julia López y Yamil O. Traña

Resumen

En la presente tesis se tuvo como objetivo principal, formular un medio de cultivo basado en el medio Ashby para la cepa de *Azotobacter chroococcum,* la que se encuentra en el laboratorio de Alimentos de la UNI-FIQ (Facultad de Ingeniería Química), para llegar a la fase exponencial en el menor tiempo, se contaba con la cepa ATCC (American Type Culture Collection). Para cumplir con este objetivo se reactivó la cepa, luego se caracterizó, y se determinó su cinética de crecimiento. De acuerdo a dicha cinética y a la bibliografía, se identificaron los factores que afectan el crecimiento de la cepa los cuales fueron Extracto de Levadura y Glucosa.

A partir de este punto se utilizó un software llamado STAGRAFICS Centurion para determinar con precisión estadística, la cantidad de corridas necesarias con las cuales determinar la mejor fórmula basados en el medio Ashby variando la cantidad de Extracto de Levadura y de Glucosa en tres niveles diferentes, se tomó el valor de la fórmula de Ashby como el valor del centro (Extracto de Levadura: 4 g/l, Glucosa: 10 g/l), y a partir de ahí se decidió variar 1 g/l para el Extracto de Levadura y 2 g/l para la Glucosa, obteniéndose 18 corridas de las cuales, son 9 con sus respectivas replicas.

Se realizaron las corridas determinadas variando los elementos antes descritos inoculando la cepa de la bacteria y dejándola incubar. Luego se procedió a leer la absorbancia cada hora, durante el tiempo necesario para obtener datos representativos.

Los datos obtenidos se procesaron en hojas de cálculo, (Absorbancia, Tiempo), dichos datos de absorbancia se convirtieron en valores UFC mediante una ecuación de una curva de calibración obtenida en la tesis (Perez, 1997), y se procedió a realizar las gráficas de Tiempo versus UFC.

Al analizar las 18 graficas obtenidas, se determinó en cuál de ellas la FASE LAG duraba menos tiempo, de esta manera se determinó el medio más adecuado y se procedió a hacer una réplica para constatar los datos.

Según los resultados obtenidos se definió que la fórmula del tratamiento 1 con su réplica el 10 y el tratamiento 4 con su réplica el tratamiento 13 poseen la mejor concentración de Extracto de Levadura y Glucosa para reducir la fase LAG.

Contenido

I. Introducción 6

II. Objetivos 9

2.1. Objetivo General 9

2.2. Objetivos Específicos 9

III. Marco de Referencia 10

3.1. Características Generales, Morfológicas Y Fisiológicas de *Azotobacter chroococcum* 10

3.1.1. Características Generales 10

3.1.2. Morfología 10

3.1.3. Fisiología 11

3.2. Unidades Formadoras de Colonias (UFC) 12

3.3. Cultivo Continuo 12

3.4. Fuente de error en el medio de conteo de placas 12

3.5. Cinética de Crecimiento 13

3.5.1. Agua 13

3.5.2. Temperatura 13

3.5.3. Nutrientes 14

3.5.4. PH 15

3.5.5. Disponibilidad de Oxigeno 15

3.5.6. Tiempo 15

3.6. Técnicas y Pruebas Microbiológicas 18

3.6.1. Tinción de Gram 18

3.6.2. Técnica de Cuenta Viable 18

3.6.3. Prueba de Catalasa 19

3.6.4. Técnica de placa estriada 20

3.6.5. Prueba de Oxidasa 20

3.6.6. Prueba de Movilidad 20

3.7. Técnicas Asépticas para Cultivos de Microorganismos 20

3.7.1. Esterilización 21

3.7.2. Técnica Aséptica de Resiembra 21
3.7.3. Preservación 22
IV. Material y Método 23
4.1. Reactivación de *Azotobacter Chroococcum* cepa ATCC. 23
4.2. Purificación de las cepas 24
4.3. Caracterización de la cepa de Azotobacter chroococcum 25
4.4. Determinación del Crecimiento Microbiano 25
4.4.1. Construcción de la Curva de Calibración 25
4.5. Curva Cinética 26
4.5.1. Preparación del Inoculo 26
4.5.2. Construcción de la Curva Cinética 26
4.6. Fase experimental 28
V. Diseño Experimental 29
5.1. Variables o Factores Independientes 29
5.2. Niveles 29
5.3. Tratamiento 30
5.4. Variable de respuesta 31
VI. Presentación y Discusión de Resultados 32
6.1. Reactivación de Cepa ATTC de *Azotobacter chroococcum* 32
6.2. Caracterización de Cepa reactivada ATTC 32
6.3. Resultados obtenidos de los tratamientos 34
VII. Conclusiones 44
VIII. Recomendaciones 45
IX. Bibliografía 46
X. Anexo 48
10.1. Tinción de Gram (López-Jácome, 2014) 48
10.2. Pasos para realizar una siembra por vertido en placa (Tovas Oviedo, 2017) 48
10.3. Prueba de Catalasa (Constanza, 2022) 48
10.4. Técnica de placa estriada (Rodriguez C. , 2018) 48
10.5. Prueba de Oxidación (Bioagar, 2021) 49
10.6. Prueba de Movilidad (Constanza, 2022) 49
10.7. Tablas y Graficas 50

ÍNDICE DE TABLAS

TABLA 1. CLASIFICACIÓN DE LOS MICROORGANISMOS DE ACUERDO A LA TEMPERATURA 14
TABLA 2. RANGOS DE pH ÓPTIMOS PARA DIFERENTES ORGANISMOS 15
TABLA 3 VARIABLES EN EL DISEÑO EXPERIMENTAL OBTENIDO POR EL SOFTWARE STAGRAPHICS CENTURION 29
TABLA 4 FACTORES Y NIVELES DE DISEÑO EXPERIMENTAL FACTORIAL OBTENIDO POR EL SOFTWARE STAGRAPHICS CENTURION 29
TABLA 5. CRUCE DE VARIABLES 30
TABLA 6. DATOS DEL TRATAMIENTO 1 52
TABLA 7. DATOS DEL TRATAMIENTO 2 52
TABLA 8. DATOS DEL TRATAMIENTO 3 53
TABLA 9. DATOS DEL TRATAMIENTO 4 53
TABLA 10. DATOS DEL TRATAMIENTO 5 54
TABLA 11. DATOS DEL TRATAMIENTO 6 54
TABLA 12. DATOS DEL TRATAMIENTO 7 55
TABLA 13. DATOS DEL TRATAMIENTO 8 55
TABLA 14. DATOS DEL TRATAMIENTO 9 56
TABLA 15. DATOS DEL TRATAMIENTO 10 56
TABLA 16. DATOS DEL TRATAMIENTO 11 57
TABLA 17. DATOS DEL TRATAMIENTO 12 57
TABLA 18. DATOS DEL TRATAMIENTO 13 58
TABLA 19. DATOS DEL TRATAMIENTO 14 58
TABLA 20. DATOS DEL TRATAMIENTO 15 59
TABLA 21. DATOS DEL TRATAMIENTO 16 59
TABLA 22. DATOS DEL TRATAMIENTO 17 60
TABLA 23. DATOS DEL TRATAMIENTO 18 60
TABLA 24. DURACIÓN DE FASE LAG 61
TABLA 25. CONTENIDO QUÍMICO DEL MEDIO DE CULTIVO PARA CONSERVACIÓN (PEREZ, 1997) 62
TABLA 26. CONTENIDO QUÍMICO DEL MEDIO DE CULTIVO ASHBY MODIFICADO PARA CONTEO EN PLACAS (PEREZ, 1997) 62
TABLA 27 CONTENIDO QUÍMICO DEL MEDIO LIQUIDO DE CULTIVO ASHBY MODIFICADO EN CANTIDAD DE EXTRACTO DE LEVADURA 63

Índice de Figuras

Figura 1. Curva de Crecimiento Bacteriano (Rodríguez E., 2021) 17
Figura 2. Técnica de Conteo de Viables (Tovas Oviedo, 2017) 19
Figura 3 Cámara de Flujo Laminar (Fuente Propia) 23
Figura 4 Incubadora (Fuente Propia) 24
Figura 5 Resiembra en Platos (Fuente Propia) 24
Figura 6 Tiras de Oxidasa (Fuente Propia) 25
Figura 7 Preparación e Inoculación de Medio de Cultivo con cepa ATTC (Fuente Propia) 26
Figura 8 Lectura de Absorbancia en Espectrofotómetro (Fuente Propia) 27
Figura 9. Esquema del proceso de Inoculación a escala de laboratorio (Fuente Propia) 27
Figura 10 Cepa reactivada de ATTC (Fuente Propia) 32
Figura 11 Realización de prueba de Catalasa (Fuente Propia) 33
Figura 12 Realización de prueba de Oxidasa (Fuente Propia) 33
Figura 13 Graficas de Tratamientos 1 y 10 35
Figura 14 Graficas de Tratamientos 2 y 11 36
Figura 15 Graficas de Tratamientos 3 y 12 37
Figura 16 Graficas de Tratamientos 4 y 13 38
Figura 17 Graficas de los Tratamientos 5 y 14 39
Figura 18 Graficas de Tratamientos 6 y 15 40
Figura 19 Graficas de Tratamientos 7 y 16 41
Figura 20 Graficas de Tratamientos 8 y 17 42
Figura 21 Graficas de Tratamientos 9 y 18 43
Figura 22. Curva de Calibración (Perez, 1997) 50
Figura 23. Cinética ATTC (Pérez, 1997) 51

Índice de Abreviaturas

UNI……. Universidad Nacional de Ingeniería

FIQ……..Facultad de Ingeniería Química

ATCC……. American Type Culture Collection

UFC……. Unidades Formadoras de Colonias

N_2……. Nitrógeno

°C…….. Grados Celsius

h……. Hora

ml…….Mililitros

g……. gramos

l…….. Litros

I. Introducción

En el mundo desarrollado, la agricultura depende en gran medida del uso de fertilizantes químicos y pesticidas para mantener las altas producciones agrícolas. La principal forma de mantener altas estas producciones, es mediante la aplicación de fertilizantes nitrogenados, pero debido al alto costo de los fertilizantes nitrogenados, la gran cantidad de energía requerida para su producción y las capacidades sub óptimas para su transportación limita su uso en países subdesarrollados, especialmente en comunidades agrícolas pequeñas (Barrera-Cobos, 2017).

Los procesos naturales de fijación biológica del N_2, juegan un rol importante en la activación de los sistemas agrícolas sustentables por su beneficio ambiental. El incremento de su aplicación, puede mitigar la necesidad del uso de fertilizantes nitrogenados, con su consiguiente efecto benéfico al ciclo del nitrógeno y el saneamiento de las aguas subterráneas y superficiales. Este proceso depende básicamente de la acción de los microorganismos en conjunto con las plantas (Corrales, 2015).

Existen algunas especies de microorganismos que poseen la habilidad de convertir el N_2 atmosférico a amonio, mediante la acción de la enzima nitrogenasa, y se les denomina diazotrofos, dentro de estos se encuentran los fijadores de vida libre los cuales fijan Nitrógeno atmosférico sin la cooperación de otras formas vivas, siendo esta la familia *Azotobacteriáceas* la que agrupa uno de las géneros más importantes utilizados en la biofertilización de diferentes cultivos (Fertilidad de Suelos y Fertilización de Cultivos, 2015).

El género *Azotobacter* presenta propiedades benéficas se ponen de manifiesto en una gran variedad de hortalizas, granos y viandas. *Azotobacter* en determinadas condiciones fija al suelo la cantidad de nitrógeno atmosférico suficiente para los cultivos, pero también ayuda a producir vitaminas y sustancias estimuladoras del crecimiento que influyen directamente en el desarrollo vegetal (Mamani, 2018).

Seguramente no hay ningún otro método más eficaz para la recuperación de nitrógeno perdido, que el proceso de fijación biológica del nitrógeno, de ahí la gran importancia de estas bacterias fijadoras, que no solamente utiliza el nitrógeno ya existente en la atmosfera, sino también el que procede de algunas transformaciones químicas, como la desnitrificación, el cual se perdería completamente si no existieran las bacterias capaces de utilizarlos. Además, estimulan la germinación de las semillas y aceleran el crecimiento de algunas

especies vegetales, siempre que sea adecuada la concentración de estas en la rizosfera de las plantas (Perez, 1997).

En la Universidad Nacional de Ingeniería existe un estudio en el cual se aislaron, purificaron y se determinaron los parámetros de crecimiento para cepas nacionales de *Azotobacter chroococcum* V y XX, así como se estudió ampliamente la cinética de crecimiento en medios químicamente formulados de Ashby modificado y Fred Y Waksman (Perez, 1997).

En el presente estudio se logró reducir el tiempo que le toma a la bacteria Azotobacter Chroococcum en llegar a la fase exponencial, esto se logró cambiando la formulación de los medios de cultivos, utilizando la cepa patrón ATCC que se encuentra en el laboratorio de alimentos de la Facultad de Ingeniería Química.

Se encuentra un trabajo experimental en condiciones semi controladas en viveros de café, demostrando que con “el uso de *Azotobacter Chroococcum* hay una mejor uniformidad en las posturas de este cultivo, así como un mayor vigor de las mismas, las cuales en el momento de la extracción del vivero hacia el campo presentaban un color uniforme en su sistema radicular, características de posturas sanas, vigorosas y con alto valor ecológico” (Rodríguez, Blanco, 1994). “Al analizar los resultados de la inoculación de 8 cepas de Azotobacter sobre los parámetros de crecimiento y desarrollo de vitroplantas, durante la fase de adaptación demostraron que en sentido general todas las cepas estudiadas estimularon el crecimiento de las vitroplantas, con valores significativamente superiores al testigo, lo que permite acortar el periodo de adaptación de las mismas” (González et al., 1994).

Con respecto a estudios que se realizan en el cultivo de la yuca, se menciona que “al analizar la respuesta a la fertilización nitrogenada y su combinación con biofertilizantes, demostraron que los mejores resultados se obtuvieron con la combinación biofertilizante-fertilización mineral, destacándose Azotobacter como biofertilizante” (Roque et al., 1994). “Los máximos rendimientos, se dan con el uso de inoculantes mixtos de Rhizobium / Azotobacter y Rhizobium / Azospirillum” (González, Lluch, 1992).

En investigaciones monográficas que se encuentran en la Universidad Nacional de Ingeniería se determinaron las condiciones para producción de biofertilizantes a partir de *Azotobacter Chroococcum* a escala de laboratorio la cual se realizó en tres etapas aislamiento y purificación, selección del medio de fermentación, y formulación del medio de fermentación con melaza clarificada utilizando para ello técnicas microbiológicas tradicionales, y los medios de cultivo de Fred y Waksman

y el Ashby. Se aislaron 100 cepas de las cuales se lograron purificar 2, la cepa V y la cepa XX. Estas cepas se desarrollaron en medio 77 de Fred y Waksman modificado, y se logró sustituir estos medios por melaza obtenida del ingenio Benjamín Zeledón (Ubicado en Rivas, Nicaragua), dando un aporte científico-técnico al país al presentar una alternativa biológica confiable como lo es un fertilizante natural obtenido de nuestro suelo (Perez, 1997).

En esta época es más crucial utilizar productos que no dañen el medio ambiente y que aumenten la productividad, por esta razón este trabajo monográfico sirve de referencia para poder utilizar la cepa de *Azotobacter Chroococcum*, cepa ATCC, para que se pueda crear y utilizar de una forma más amplia como un biofertilizante enteramente nacional y que se adapte a las necesidades agrícolas de Nicaragua.

Este estudio da la oportunidad de crear más conocimiento sobre la bacteria del género Azotobactericae para que los datos estén disponibles para futuros estudios que ahonden más sobre posibles usos que se puedan encontrar sobre esta bacteria.

Se necesita optimizar y mejorar los medios de cultivo para llegar a la fase exponencial en menor tiempo, de esta manera los tiempos para la utilización de esta bacteria se reducen y se puede utilizarla en biofertilizantes con más facilidad.

II. Objetivos

2.1. Objetivo General

Formular un medio de cultivo químicamente definido para la cepa de *Azotobacter chroococcum* ATCC, basado en el medio de Ashby, en el laboratorio de Alimentos en el periodo Junio -diciembre 2022.

2.2. Objetivos Específicos

- Caracterizar morfológicamente cepa existente en Laboratorio de Alimentos de *Azotobacter chroococcum* por medio de pruebas bioquímicas.
- Identificar parámetros que influyen en la velocidad de crecimiento de *Azotobacter chroococcum*.
- Desarrollar las corridas cinéticas necesarias para alcanzar la fase exponencial en el menor tiempo en medio Ashby para cepa ATCC.
- Formular medios de fermentación para la cepa ATCC basados en la cinética de crecimiento seleccionada para disminuir la fase LAG.
- Evaluar la cinética de crecimiento de la cepa ATCC con el medio de cultivo reformulado.

III. Marco de Referencia

Azotobacter chroococcum es una bacteria utilizada principalmente como fijadora de nitrógeno. Este género de bacterias es utilizado extensamente en la producción agrícola mundial ya que le aporta a las plantas hasta el 50 % de sus necesidades de nitrógeno mediante la fijación asociativa del elemento que llevan a cabo a partir de la atmosfera, además de suministrar a las plantas sustancias activas estimuladoras del crecimiento (InfoAgro, 2022).

3.1. Características Generales, Morfológicas Y Fisiológicas de *Azotobacter chroococcum*

3.1.1. Características Generales

Bacterias no proteolíticas y catalasa positiva. El rango de pH para el crecimiento en presencia de nitrógeno combinado es de 4.8-8.5; el pH óptimo para crecer y fijar nitrógeno es 7 .0-7.5. No producen endoesporas, pero forman quistes. Gram negativa. La movilidad ocurre por flagelos perítricos, aeróbicas, pero pueden crecer bajo condiciones tensas de oxígeno. Pigmentos solubles en agua, Quimiorganotróficas. La temperatura óptima de crecimiento está entre 32-37^{o}C (InfoAgro, 2022).

3.1.2. Morfología

Familia: **Azotobacteriaceae.**

Género: **Azotobacter**

Especie: **chroococcum**

Según los conocimientos modernos *Azotobacter chroococcum* presenta tres formas diferenciales, de acuerdo con la edad de la célula:

- Células Jóvenes: comprenden bastoncitos móviles perítricos, de 2 a 4 micras de largo.
- Células adultas: comprenden formas esféricas grandes y pequeñas, inmóviles, de 2 a 4 micras de diámetro, las cuales presentan granulaciones correspondientes a cuerpos meta cromáticos, lipoide, glicógenos, etc.;
- Células envejecidas: se presentan enquistadas formando células concoideas de tamaño mayor, las cuales, pueden germinar y regenerar las formas jóvenes; la presencia de ciertas sustancias carbonadas forma células gigantes.

Además de estos estados celulares, se conocen otros fenómenos reproductivos que son formaciones intracelulares que, una vez libres, regeneran la forma normal (Brock & Madigan, 2015).

3.1.3. Fisiología

La capacidad de fijación de estas bacterias (Azotobacter) varía considerablemente en dependencia de la composición del medio nutritivo, de su acidez, de la temperatura y aireación, de la presencia de fuentes de nitrógeno combinado, de la naturaleza de las fuentes de carbono y de los micro elementos Al estudiar el efecto de diferentes fuentes de carbono sobre la fijación del nitrógeno por el género Azotobacter, se encontró que la productividad de la fijación depende de la estructura de la sustancia orgánica y de las reservas de energía química utilizable que contiene, siendo también importantes los procesos de oxidación de la materia orgánica durante la respiración. Varias sustancias pueden actuar como fuente de carbono, entre ellos los carbohidratos (monosacáridos, disacáridos y algunos polisacáridos), ácidos alifáticos y aromáticos, alcoholes, compuestos volátiles, etc. Las distintas especies, y aún cepas dentro de una misma especie, difieren en cuanto a las fuentes de carbono que utilizan (Brock & Madigan, 2015).

En el suelo, estas bacterias utilizan una amplia gama de compuestos orgánicos y de productos de descomposición de plantas y animales; en particular, se ha observado una intensa propagación de estos microorganismos en suelos donde hay mucha paja o compost que contiene celulosa. Esto se explica por la capacidad que tienen estas bacterias para asimilar las sustancias formadas en el sustrato durante la descomposición de la celulosa. Se ha comprobado que, en suelos ricos en humus, cuando no hay residuos orgánicos frescos, la población de Azotobacter es pobre (Rivas Zuñiga, 2021).

La propagación de las bacterias del género Azotobacter, está relacionada estrechamente con la presencia en el medio de suficientes cantidades de fósforo y de potasio, y es mayor el efecto en el caso del fósforo, cuya escasez o ausencia puede hasta inhibir el desarrollo del cultivo. Este elemento estimula el metabolismo del carbono, la multiplicación y la fijación del nitrógeno (Brock & Madigan, 2015).

El calcio y el magnesio desempeñan un papel muy importante en el metabolismo del género Azotobacter, son muy elevados sus requerimientos de calcio. Cuando en el medio hay deficiencia de este elemento, ocurre una prolongación de la fase LAG del desarrollo, se observa una intensa vacuolación de las células y se perturban todos los procesos metabólicos. Está demostrado también que las necesidades de calcio son iguales para todas las especies. En lo que respecta al magnesio, las concentraciones necesarias son diez veces mayores que las de

hierro. Aunque no está claramente demostrado en cuáles procesos fisiológicos participan estos dos elementos, se conoce que son imprescindibles para que realice la fijación. Los requerimientos de hierro son muy pequeños, se localiza este elemento en la membrana citoplasmática. El manganeso ejerce una acción favorable, aunque tampoco es esencial (Rivas Zuñiga, 2021).

3.2. Unidades Formadoras de Colonias (UFC)

Se denomina **Unidad Formadora de Colonia (UFC)** a una célula viva y aislada que se encuentra en un substrato y en condiciones ambientales adecuadas y produce una colonia en un lapso de tiempo (Brock & Madigan, 2015).

3.3. Cultivo Continuo

Es cuando el crecimiento ocurre en un volumen prefijado que está siendo alterado continuamente por el crecimiento microbiano. Un cultivo continuo es esencialmente un cultivo de volumen constante al que se añade medio fresco y el que rebosa medio usado con células y el estadio metabólico se mantiene constante se dice entonces que se alcanza el equilibrio. Durante la producción de biomasa se trabajará lo más rápido posible debido a que un proceso largo está sujeto a mayor contaminación. Para tal propósito la prevención de la contaminación debe ser parte de la técnica del método y algo más que nos ayudara es la utilización del equipo adecuado. Sin embargo, el método de cultivo continuo es capaz en algunos casos de eliminar los contaminantes que se puedan adquirir (Padilla Espinoza, 2023).

3.4. Fuente de error en el medio de conteo de placas

El número de colonias que se obtienen en un contaje viables depende no solamente del tamaño del inoculo, sino también del medio de cultivo y de las condiciones de incubación empleadas, así como de la longitud de incubación. Las colonias depositadas sobre el medio de cultivo no desarrollaran colonias al mismo tiempo de modo que si el tiempo de incubación se obtendrá un número más bajo de lo real. Además de que el tamaño de la colonia varía ampliamente de modo que las colonias muy pequeñas puedan no ser contadas. El contaje de viables

puede ser fuente de errores muy grandes de modo que hay que tomar muchas precauciones y replicar las placas de las diluciones claves (Rodriguez, 2018).

3.5. Cinética de Crecimiento

Para todos los microorganismos, existen condiciones que deben existir para que estos crezcan y se multipliquen, si dichas condiciones son óptimas los microorganismos incrementaran en número (Brock & Madigan, 2015).

Las condiciones ambientales que influyen en la cinética del crecimiento son:

- Agua
- Temperatura
- Nutrientes
- PH
- Disponibilidad de oxígeno
- Tiempo

3.5.1. Agua

El agua participa en las reacciones internas de las células. Es el componente que se encuentra en mayor cantidad. Facilita el paso de sustancias alimenticias solubles; a través de ésta, los nutrientes son transportados hacia el interior de las células y de la misma forma los productos de desecho son eliminados por el agua (Brock & Madigan, 2015).

3.5.2. Temperatura

La temperatura es un factor importante que afecta el comportamiento de las células. A diferencia de las reacciones químicas convencionales donde generalmente un aumento de temperatura se traduce en un incremento en la velocidad de reacción, los microorganismos presentan temperaturas óptimas para el desarrollo de sus actividades, principalmente debido a que a temperaturas fuera de su rango de actividad óptimo, se tiene inactivación de algunas enzimas y en algunos casos, el microorganismo muere. De acuerdo a lo anterior, es posible clasificar tal y como presenta en la siguiente tabla (Brock & Madigan, 2015).

Tabla 1. Clasificación de los microorganismos de acuerdo a la temperatura

Microorganismos	Temperatura Optima ^{0}C
Psicrófilos	≤20
Mesófilos	20-50
Termófilos	≥50

3.5.3. Nutrientes

Debido a que las bacterias del género Azotobacter están clasificadas como autótrofos, ellas utilizan los nutrientes que tienen a su alrededor para crear un aprovisionamiento de energía y un suministro de materiales para la síntesis celular. Por esta razón necesitan una variedad de nutrientes para suplir sus necesidades específicas, ya que sin una fuente de nutrientes todo microorganismo cesa su crecimiento y en este caso la bacteria entraría en una fase de muerte más rápido. Todos los organismos requieren de fuente de alimentos que provean los elementos químicos básicos, de los cuales el protoplasma de las células es construido y actúa como una fuente de energía. Estos elementos son: carbono, hidrógeno, oxígeno, nitrógeno, azufre, fósforo, magnesio, hierro y otros. En la naturaleza, estos elementos se encuentran combinados, formando parte de sustancias orgánicas o inorgánicas. Algunos de los nutrientes serán incorporados para construir macromoléculas y estructuras celulares; otros solo sirven para la producción de energía, y no se incorporan directamente como material celular; finalmente, otros pueden ejercer ambos papeles (Brock & Madigan, 2015).

Algunos autores señalan la necesidad de incluir vitaminas en el medio, aunque normalmente ninguno de los medios conocidos tiene en su composición, limitándose como máximo a incluir extracto de suelo, pero esto no basta para satisfacer las necesidades en factores de crecimiento, por lo que ha recomendado al medio nutritivo, Extracto de Levadura entre 0.3 y 0.5 %. (Gaitan & Garcia, 1998).

Resultados evidenciaron que la aplicación en secuencia de diseños estadísticos demostró ser una estrategia confiable permitiendo una producción de células viables, empleando una combinación optima estimada basada en Extracto de Levadura, glutamato mono sódico, Glucosa, y solución de micronutrientes (Moreno, 2011).

3.5.4. PH

Los microorganismos pueden crecer y multiplicarse únicamente dentro de cierto rango de pH, Si los microorganismos no cuentan con el pH correspondiente esto provocará la inhibición de su crecimiento y desarrollo (Brock & Madigan, 2015).

Tabla 2. Rangos de pH óptimos para diferentes organismos

Organismo	Rango de pH Optimo
Bacterias	6.0-8.0
Levaduras	4.0-6.0
Hongos	3.0-7.0
Células vegetales	5.0-6.0
Células Animales	6.5-7.5

Nota: En el caso de *Azotobacter chroococcum* el PH se encuentra entre 7-7.5

3.5.5. Disponibilidad de Oxigeno

La relación entre el oxígeno y el crecimiento microbiano varia ampliamente de una especie a otra, los microorganismos aerobios obligados requieren la presencia constante de oxígeno porque para generar energía, requieren dicho elemento como aceptor terminal de electrones. Los microorganismos aerobios requieren de oxígeno del ambiente que los rodea para respirar. Por tanto, es necesario garantizar a la especie bacteriana en cuestión un ambiente donde pueda obtener fácilmente la cantidad de oxígeno que ésta requiere (Brock & Madigan, 2015).

Debido a que la Tierra contiene una atmósfera rica en oxígeno y, por consiguiente, proporciona un entorno oxidante, muchos elementos tienden a combinarse con el oxígeno, en el caso de la bacteria *Azotobacter chroococcum* obtiene la mayor cantidad de este elemento mientras se encuentre más cerca de la superficie (Padilla Espinoza, 2023).

3.5.6. Tiempo

El crecimiento y reproducción de las bacterias ocurre a medida que nutrientes son procesados e incorporados como nuevo material de célula. Las poblaciones bacterianas pueden alcanzar altas densidades muy rápidamente. Las células

individuales se duplican a una tasa característica para cada organismo (Rodriguez E. , 2021).

La cinética de crecimiento de una población bacteriana se compone de la siguiente serie de fases:

1- Fase LAG
2- Fase Exponencial
3- Fase Estacionaria
4- Fase de Muerte o Declinación

Fase LAG

Cuando una población microbiana es inoculada en un medio fresco el crecimiento no empieza inmediatamente sino después de cierto tiempo después de que Las células se ajustan a su nuevo ambiente ya que ellas pueden tener deficiencias en ciertas enzimas y coenzimas por lo que durante esta etapa se produce la síntesis de estos materiales esta etapa se conoce como fase LAG la cual puede ser breve o larga dependiendo de las condiciones. Si un cultivo que crece exponencialmente es inoculado al mismo medio bajo las mismas condiciones de crecimiento, no se observa la fase LAG y el crecimiento exponencial continuo a la misma velocidad. Sin embargo, si el inoculo se toma de un cultivo viejo (fase estacionaria) generalmente se presenta a la fase estacionaria larga aun cuando las cuando todas las células del inoculo estén vivas. Esto se debe a que las células generalmente agotan diferentes coenzimas esenciales u otros constituyentes celulares y se requiere cierto tiempo para su síntesis un retraso también se presenta cuando el inoculo está formado por células que han sido lesionadas, como calor, radiación, sustancias químicas etc. (Rodríguez E., 2021).

Fase Exponencial

Es la consecuencia del fenómeno de la división de una población en donde cada célula está creciendo y dividiéndose continuamente. Después de cada división celular, las nuevas células hijas inician inmediatamente un nuevo ciclo de proliferación que produce otra vez la división. En esta fase la población se duplica a intervalos regulares. Este es el período de más rápido crecimiento bajo condiciones óptimas (Rodriguez E. , 2021).

Para un organismo dado, la velocidad de crecimiento varía con las condiciones ambientales y con la composición del medio de cultivo. En un medio rico, con muchos constituyentes celulares preformados, la velocidad del crecimiento es

generalmente más rápida que en un medio pobre en donde la célula debe sintetizar todos estos elementos por sí misma (Rivas Zuñiga, 2021).

Fase Estacionaria

El período durante el cual el crecimiento de una población cesa se denomina fase estacionaria en esta fase el número de células que son producidas iguala al número de células que mueren se establece un equilibrio dinámico en el cual no existe un mayor crecimiento. Las limitaciones de este proceso se deben al agotamiento de algún nutriente o a que se acumule algún producto metabólico tóxico (Rodriguez E. , 2021).

Fase de Muerte o Declinación

Si la incubación continúa después de que una población alcanza la fase estacionaria, las células pueden seguir vivas y continuar metabolizando, pero lo más probable es que mueran. Si esto último sucede, la población se encuentra en la fase de muerte. Durante esta fase, el conteo microscópico directo puede permanecer constante, pero la viabilidad disminuye lentamente. La fase de muerte se alcanza cuando la tasa de destrucción supera la tasa de crecimiento (Rodriguez E. , 2021).

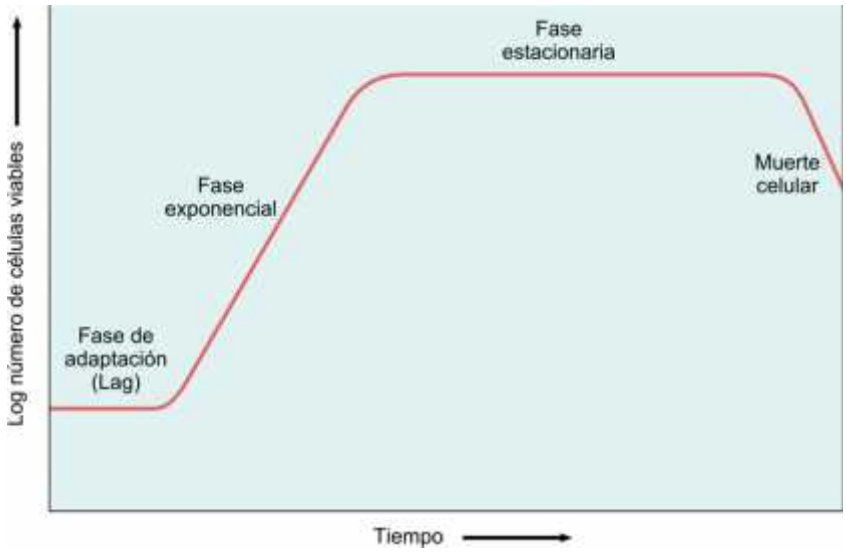


Figura 1. Curva de Crecimiento Bacteriano (Rodríguez E., 2021)

3.6. Técnicas y Pruebas Microbiológicas

Las pruebas y técnicas microbiológicas que se utilizan durante la fase experimental son las siguientes:

- Tinción de Gram
- Técnica de Cuenta Viable
- Prueba de Catalasa
- Técnica de Placa Estriada
- Prueba de Oxidasa
- Prueba de Movilidad

3.6.1. Tinción de Gram

La diferenciación de Gram se basa en el color que adquieren las bacterias cuando se tratan con el colorante cristal violeta seguido por una solución yodurada de potasio. Ciertos organismos pierden la coloración violeta con facilidad cuando se aplica una solución de alcohol, en tanto que otros lo pierden con una gran lentitud, el microorganismo que no puede retener la tinción con cristal violeta toma la coloración de contraste, por ende, toma una coloración rosa a roja; a estos microorganismos se les denomina Gram negativos (López-Jácome, 2014).

3.6.2. Técnica de Cuenta Viable

El crecimiento de una población microbiana se mide siguiendo los cambios en el número de células o el peso de la biomasa celular existen diversos métodos para contar el número de células o para estimar la masa celular dependiendo del microorganismo de que se trate. En este caso se estará interesado en contar solo células vivas y para ello se han desarrollado métodos de contaje para viables (Tovas Oviedo, 2017).

Diluciones

Está claro que el número de colonias que se desarrollan en un plato no deben de ser muy elevados para poder contar adecuadamente y por otra parte el número de colonias no debe de ser muy bajo para que el contaje tenga un significado estadístico. Para obtener un número de colonias apropiado la muestra debe ser casi siempre diluida. Normalmente es necesario hacer más de una dilución, generalmente seriadas en base diez (Tovas Oviedo, 2017).

Siembra por Vertido en Placa

Es un método que incluyen siembra, identificación y conteo de bacterias. Esta técnica tiene la finalidad de obtener colonias aisladas para la obtención de un cultivo puro, o bien para la cuantificación (Tovas Oviedo, 2017).

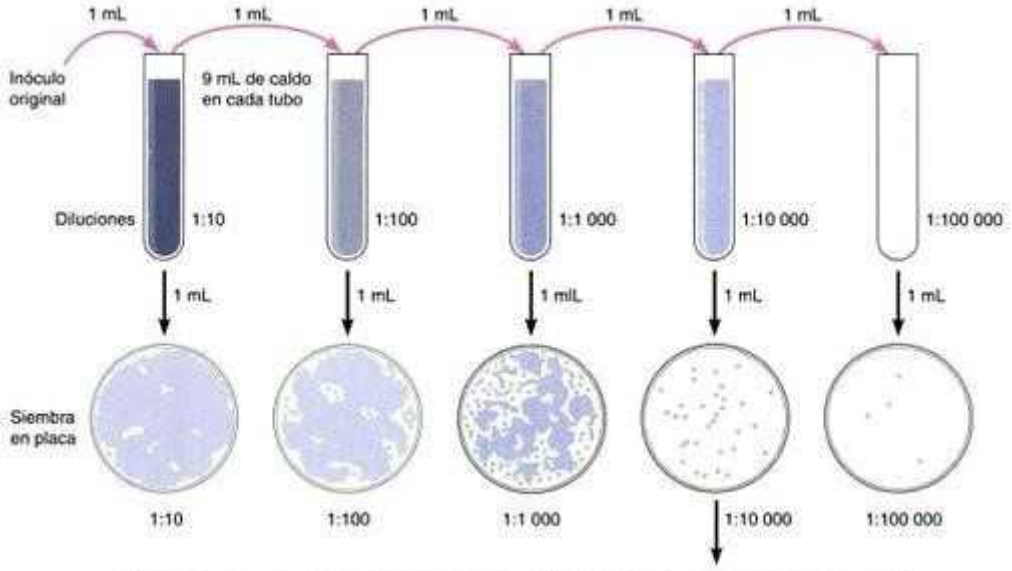


Figura 2. Técnica de Conteo de Viables (Tovas Oviedo, 2017)

3.6.3. Prueba de Catalasa

La enzima catalasa descompone el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) en agua y oxígeno bajo la fórmula $2H_2O_2 \rightarrow 2H_2O + O_2$ De esta manera las bacterias se protegen del efecto tóxico del H_2O_2 que es un producto final del metabolismo aerobio de los azúcares. Los aerobios y aerobios facultativos generalmente contienen la enzima catalasa y SOD, aunque algunos de los anaeróbicos obligados carecen de catalasa. Ambos son indispensables para las células aeróbicas y su ausencia en los anaeróbicos obligados es la razón por la que el oxígeno es toxico para ellos (Constanza, 2022).

3.6.4. Técnica de placa estriada

El método para la preparación de una placa estriada incluye la diseminación de una solo asa de materia con los microorganismos sobre la superficie de un medio con agar que ya este solidificado. Tiene como objetivo obtener de un elevado número de bacterias un número reducido de colonias sobre la superficie de la placa (Rodriguez C. , 2018).

3.6.5. Prueba de Oxidasa

Los citocromos son hemoproteínas que actúan como enzimas oxidadores en las cadenas de transporte de electrones de la fosforilación oxidativa. Generalmente solo se encuentran citocromos en las bacterias respiradoras aerobias, mientras que los anaerobios estrictos carecen de ellas. La sustancia que reduce el reactivo oxidasa es el citocromo-c, de forma que, en realidad, la prueba solo determina la presencia de este citocromo y por lo tanto solo es positiva para aquellas bacterias que lo poseen en sus cadenas respiratorias (Bioagar, 2021).

3.6.6. Prueba de Movilidad

Sirve para determinar si un organismo es móvil o inmóvil, las bacterias tienen movilidad por medio de sus flagelos que se encuentran principalmente entre los bacilos (Constanza, 2022).

3.7. Técnicas Asépticas para Cultivos de Microorganismos

El crecimiento de un microorganismo de cultivo puro, deberá estar libre de cualquier otro contaminante. Como los microorganismos se encuentran en todo nuestro entorno la obtención y mantenimiento de estos cultivos requieren de la eliminación de otros contaminantes presentes en los medios de cultivos (esterilización), aislamiento, el traslado de los microorganismos de un lugar a otro (resiembra aséptica) y la preservación del cultivo (Rodriguez C. , 2018).

3.7.1. Esterilización

Los métodos de esterilización eliminan todos los microorganismos viables de una región específica. Toda la cristalería, azas y medios a utilizar deben de estar libres de contaminantes antes de ser usados. Los matraces para los cultivos deben de estar sellados o tapados con tapones estériles para prevenir la contaminación de los mismos. Para la preparación de muchos medios de cultivo se requiere de una autoclave para esterilizar que permita la exposición del medio a alta temperaturas durante periodos determinados (Rodriguez C. , 2018).

3.7.2. Técnica Aséptica de Resiembra

En la actualidad las placas de Petri que se utilizan para el desarrollo de cultivos de microorganismos, ya vienen esterilizados por el fabricante por lo que el llenado de estos con el medio de cultivo, requieren de técnica asépticas también para poner el medio de cultivo se necesita flamear la boca de los matraces para matar cualquier microbio indeseable en la superficie, para pasar el cultivo de un matraz a otro. Por técnica aséptica los microbiólogos entienden que es tomar todas las precauciones necesarias para prevenir la contaminación del cultivo. Las técnicas adecuadas de resiembra también protegen al microbiólogo de la contaminación con el cultivo, el cual siempre debe ser considerado como patógeno, esta técnica involucra mantener al cultivo puro, medios y superficie estéril del matraz de crecimiento, fuera de todo contacto con microorganismos contaminantes.

Entre algunas precauciones que se deben tomar están:

- El área de trabajo se limpia con un antiséptico.
- Los instrumentos para transferencia deberán ser esterilizados.

Los pasos normales para transferir un cultivo de un recipiente a otro son:

- Flamear el asa de siembra,
- Tomar una colonia de microorganismos y transferir en el medio.
- Flamear la boca de los recipientes y taparlos nuevamente.
- Flamear otra vez el asa de siembra.

Esencialmente se emplea la misma técnica para resembrar cajas de Petri y para pasar microorganismos de un matraz de cultivo a un portaobjetos (Flores Rodríguez, 2022).

3.7.3. Preservación

Es necesario mantener en condiciones viables, libres de contaminantes y durante un periodo deseado al cultivo. Existen varios métodos disponibles para mantener y conservar al cultivo puro. Los microorganismos pueden simplemente ser resembrados periódicamente en o sobre medios de cultivo para permitir el crecimiento continuo y asegurar la viabilidad de un cultivo patrón. Se deben emplear técnicas de resiembra aséptica adecuadas cada vez que se resiembra el microorganismo, ya que siempre existe peligro de contaminación, más aún repetir la resiembra lleva mucho tiempo, lo cual hace difícil mantener con éxito grandes cantidades de cultivos puros durante periodos indefinidos. Por eso se han desarrollado gran variedad de métodos para preserva estos cultivos de tal forma que no necesiten estar siendo resembrados para mantener su viabilidad. La elección del método de preservación depende de la naturaleza del cultivo y de los medios de los que se disponga (Flores Rodriguez, 2022)

IV. Material y Método

Los microorganismos que se utilizaron en todo el proceso experimental fueron *Azotobacter chroococcum* (cepa ATCC), dicha cepa se encuentra en el laboratorio de alimentos la cual fue aislada y purificada en un trabajo de tesis realizado en la facultad de ingeniería química (Perez, 1997).

4.1. Reactivación de *Azotobacter Chroococcum* cepa ATCC.

La cepa *Azotobacter chroococcum* (ATCC) se reactivó utilizando la técnica de resiembra en tubos y luego rallado en platos.

Se introdujo aproximadamente 10ml de medio en 6 tubos, se dejaron enfriar en superficie inclinada dentro de la cámara de flujo laminar Asalair Vertical 700 con el objetivo que el medio se solidifique y posteriormente se procedió a la siembra de la cepa (Tovas Oviedo, 2017).

Figura 3 Cámara de Flujo Laminar (Fuente Propia)

Una vez realizada la siembra, los tubos ya inoculados se dejaron incubando a una temperatura de 37^0C en una incubadora Vinder durante un periodo de 24h (Tovas Oviedo, 2017).

Figura 4 Incubadora (Fuente Propia)

Luego de completarse el periodo de incubación los tubos con crecimiento fueron utilizados para realizar una resiembra en plato.

4.2. Purificación de las cepas

La resiembra en plato se realizó con el objetivo de purificar las cepas de alguna contaminación que pudo haberse formado anteriormente, ya sea por almacenamiento o manipulación.
En este caso se preparó un medio solido de cultivo Ashby modificado que se utilizara para aislar colonias, colonias que posteriormente se sometieron a diferentes pruebas microbiológicas y así poder confirmar la pureza de las cepas (Tovas Oviedo, 2017).

Figura 5 Resiembra en Platos (Fuente Propia)

4.3. Caracterización de la cepa de Azotobacter chroococcum

De las cepas obtenidas de la purificación se tomó una muestra con un asa para realizarle diferentes pruebas microbiológicas, como son: tinción de Gram, prueba de Catalasa, Prueba de Oxidasa y Prueba de Movilidad, esto con el fin de verificar que la cepa con la que se trabajo fue *Azotobacter chroococcum*.

Prueba de Oxidasa: se realizó Por medio de tiras de oxidasas 40560-100STRIP-F.

Figura 6 Tiras de Oxidasa (Fuente Propia)

4.4. Determinación del Crecimiento Microbiano

A continuación, se detalla el proceso para reducir el tiempo de la fase LAG de la cepa ATCC.

4.4.1. Construcción de la Curva de Calibración

En este caso no se construyó una curva de calibración, se tomó de referencia la obtenida en un trabajo de tesis realizado en la facultad de ingeniería química (Perez, 1997).Ver anexo Figura 23

4.5. Curva Cinética

Se construyó la curva cinética con el medio de Ashby modificado y se procedió de la siguiente manera:

- Preparación del Inoculo
- Construcción de la curva

4.5.1. Preparación del Inoculo

Se preparó un inoculo de 50ml que corresponde al 10% del volumen total a fermentar, en fase exponencial lo cual ayudar a disminuir la fase LAG. El tiempo que se estimó para que el inoculo llegue a la fase exponencial fue de 6h aproximadamente (Perez, 1997).

4.5.2. Construcción de la Curva Cinética

Para la construcción de la curva cinética se consideraron parámetros de unidades formadoras de colonias (UFC) y Tiempo.

Una vez preparado el inoculo con la cepa ATCC se inoculo en 1 Erlenmeyer con 450ml de medio líquido, los cuales se fermentaron por un periodo de 10 h a 80 rpm en constante agitación a una temperatura que se encuentre entre 32-37^{0}C (Perez, 1997). Ver figura 7

Figura 7 Preparación e Inoculación de Medio de Cultivo con cepa ATTC (Fuente Propia)

Se tomó muestra cada hora durante 10 horas para medir la absorbancia de la muestra con la cepa en un espectrofotómetro Agilent, Modelo 8453, debidamente cualificado a una λ= 540 nm, estas mediciones se introdujeron a la curva de

calibración (Perez, 1997).Ver anexo Figura 22 en la cual se obtuvieron valores de UFC datos con lo que se construyó la curva de crecimiento.

Figura 8 Lectura de Absorbancia en Espectrofotómetro (Fuente Propia)

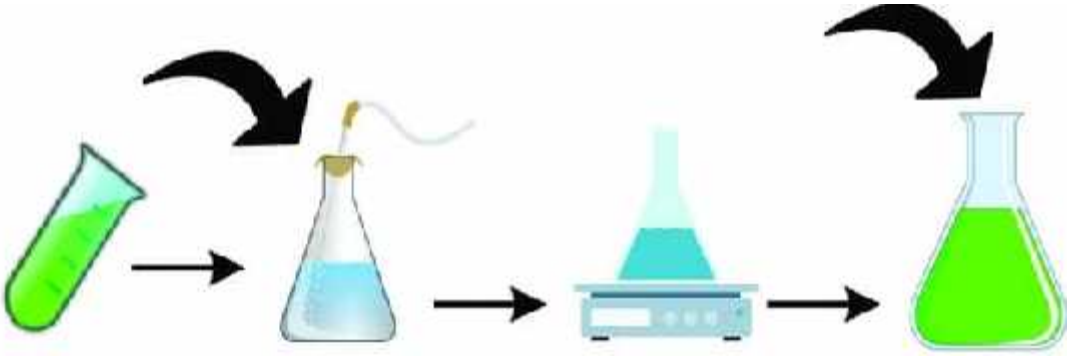


Figura 9. Esquema del proceso de Inoculación a escala de laboratorio (Fuente Propia)

Se construyeron curvas de crecimiento para la cepa utilizando el mismo procedimiento antes descrito, con la diferencia que en cada corrida se varió la formulación de los medios de cultivo.

Para ello se construyeron 18 curvas de crecimiento en medio Ashby, variando las proporciones de Glucosa y Extracto de Levadura, esto con el fin de reducir la fase LAG. Luego de realizar las corridas y construir las curvas de crecimiento se comparó cada una y se seleccionó la corrida en la cual la fase LAG sea más corta o nula. Una vez seleccionado el medio en que la fase LAG fue mínima, se procedió a construir una curva de crecimiento con el medio modificado y se realizó un duplicado para constatar los resultados obtenidos.

4.6. Fase experimental

Se tomaron como variables independientes del medio de cultivo Ashby, el Extracto de levadura y la Glucosa, dado que estas influyen en el crecimiento bacteriano.

A estas dos variables se les asignaron los valores de Alto, Intermedio y Bajo, tomando como valor intermedio el valor de referencia del medio Ashby.

Estos valores de referencia son:

- Extracto de Levadura: 4 g/l
- Glucosa: 10 g/l

Para determinar el diseño de experimentos se utilizó un programa que dio el orden y la cantidad de cada variable a utilizada en cada experimento.

A estos diferentes medios obtenidos se les midió la absorbancia para determinar cuál es el medio que llega a la fase exponencial primero o en otras palabras cual medio acorta más su fase LAG.

V. Diseño Experimental

5.1. Variables o Factores Independientes

En la investigación se requirió de un diseño experimental multifactorial donde se requerirá cambiar los valores de dos variables de manera simultánea: concentración de Extracto de Levadura y concentración de Glucosa.

Tabla 3 Variables en el diseño experimental obtenido por el software Stagraphics Centurion

Nombre	Unidades	Tipo	Papel	Niveles
A- Conc de Levadura	g/l	Categórico	Controlable	Bajo:3 Medio:4 Alto:5
B- Conc de Glucosa	g/l	Categórico	Controlable	Bajo:8 Medio:10 Alto:12

5.2. Niveles

En este diseño se involucró combinaciones entre los niveles de los dos factores o variables independientes, con la finalidad de determinar su efecto en el tiempo que dura la fase LAG. En la siguiente tabla se muestran los niveles que se utilizaron:

Tabla 4 Factores y niveles de diseño experimental factorial obtenido por el software Stagraphics Centurion

Factores	Niveles	Observación
Concentración de levadura	3	Bajo (3 g/L) Medio (4 g/L) Alto (5 g/L)
Concentración de glucosa	3	Bajo (8 g/L) Medio (10 g/L) Alto (12 g/L)

5.3. Tratamiento

Para determinar el número de tratamientos para el diseño experimental se utilizó el software STAGRAFICS Centurión, utilizando el diseño factorial multinivel.

- Número de Factores Experimentales: 2
- Niveles: 3
- Número de Respuestas: 1
- Número de Corridas: 18

En la Tabla 5 se muestra el resultado obtenido por el software.

Tabla 5. Cruce de variables

No	Factor A	Factor B
1	5	10
2	4	10
3	3	10
4	5	12
5	4	12
6	4	8
7	3	8
8	3	12
9	5	8
10	5	10
11	4	10
12	3	10
13	5	12
14	4	12
15	4	8
16	3	8
17	3	12
18	5	8

5.4. Variable de respuesta

La variable respuesta para los factores que se manipularon en este caso fue Tiempo de Fase LAG

VI. Presentación y Discusión de Resultados

6.1. Reactivación de Cepa ATTC de *Azotobacter chroococcum*

La cepa de *Azotobacter chroococcum* que se encontraba en el laboratorio se reactivó en un medio sólido, en los 6 tubos en los que se inoculo hubo crecimiento bacteriano. A partir de estos tubos con crecimiento se realizaron todas las demás fases de la presente tesis, como es la caracterización y fueron la fuente para la inoculación en los 18 tratamientos, después de cada tratamiento se realizaba una inoculación para guardarla para el siguiente tratamiento.

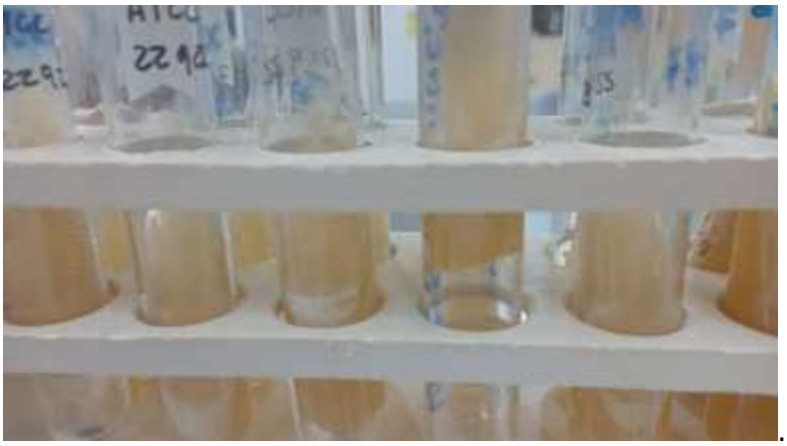


Figura 10 Cepa reactivada de ATTC (Fuente Propia)

6.2. Caracterización de Cepa reactivada ATTC

Para la caracterización de Azotobacter *chroococcum* se realizaron las pruebas microbiológicas como la tinción de Gram, catalasa, oxidasas y movilidad.

- La tinción de Gram se llevó al microscopio donde se observó una coloración de rosa a roja lo cual nos indica que es gran negativa.
- Se realizó prueba de catalasa, dando como resultado catalasa positiva.

Figura 11 Realización de prueba de Catalasa (Fuente Propia)

- Las pruebas realizadas a la cepa dieron como resultado un valor positivo para Oxidasa.

Figura 12 Realización de prueba de Oxidasa (Fuente Propia)

- Para la prueba realizada de Movilidad se observó directamente en el microscopio lo cual dio el resultado de movilidad positiva.

6.3. Resultados obtenidos de los tratamientos

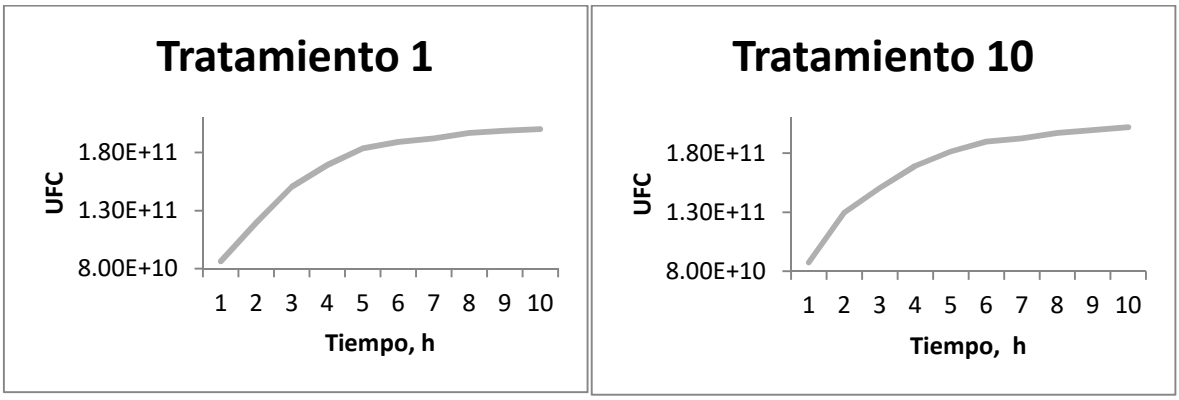
Los datos de absorbancia fueron obtenidos midiendo la muestra a los tiempos que se corresponden, estos datos mostrados en las tablas de los diferentes tratamientos son el resultado de los promedios obtenidos a partir de 2 mediciones, los datos de UFC fueron obtenidos mediante la ecuación: UFC = 7E+10x - 5E+08 Donde x es la absorbancia.

Esta ecuación se obtuvo de una tesis elaborada anteriormente en la facultad (Perez, 1997).

Los resultados obtenidos fueron comparados con los resultados de la cinética de crecimiento obtenida con Ashby modificado en una tesis que se encuentra en la Facultad de Ingeniería Química figura 23 del anexo, titulada *Produccion de Biofertizante a partir de Azotobacter Chroococcum.* (Perez, 1997).

Tratamiento 1 y Tratamiento 10

En la curva de crecimiento para medios con concentraciones de Levadura de 5 g/l y de Glucosa de 10g/l la fase LAG es prácticamente nula alcanzando así prácticamente de inmediato la fase exponencial, esto debido a la concentración de levadura ya que esta es la principal fuente de energía que aporta a la bacteria. Ver Figura 13.



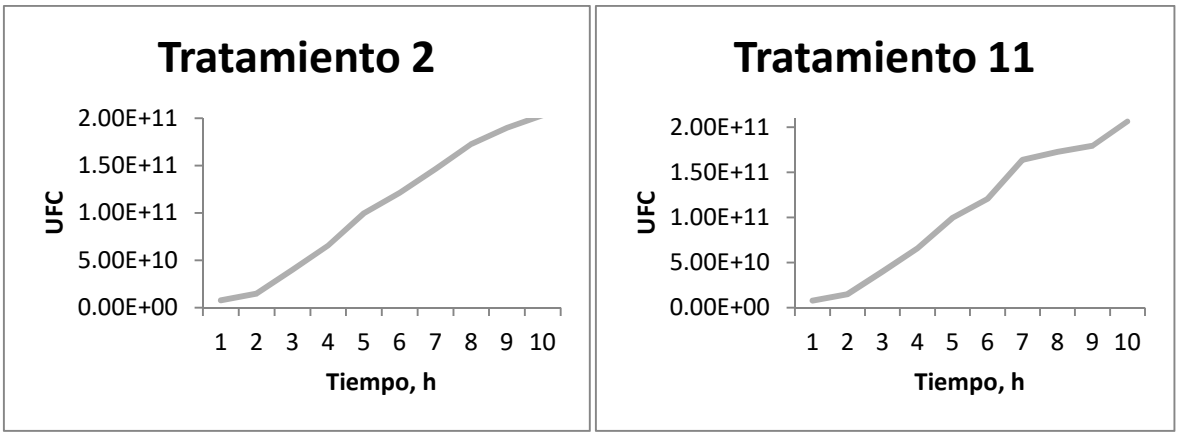
Nota: Los datos obtenidos de los tratamientos 1 y 10 se encuentran en anexos, tablas 6 y 15 respectivamente

Figura 13 Graficas de Tratamientos 1 y 10

En la cinética presentada en la gráfica de ATTC de anexo, figura 23 se puede observar que la fase LAG tarda 4 horas, a diferencia de los tratamientos 1 y 10 de este trabajo en el cual la fase LAG es nula, esto como ya hemos visto se debe a la concentración de Extracto de Levadura. Obteniendo mejores resultados que en la gráfica de ATTC de anexo figura 23.

Tratamiento 2 y Tratamiento 11

En la curva de crecimiento para medios con concentraciones de Levadura de 4g/l y de Glucosa de 10g/l la fase LAG dura 1 horas. Ver Figura 14.



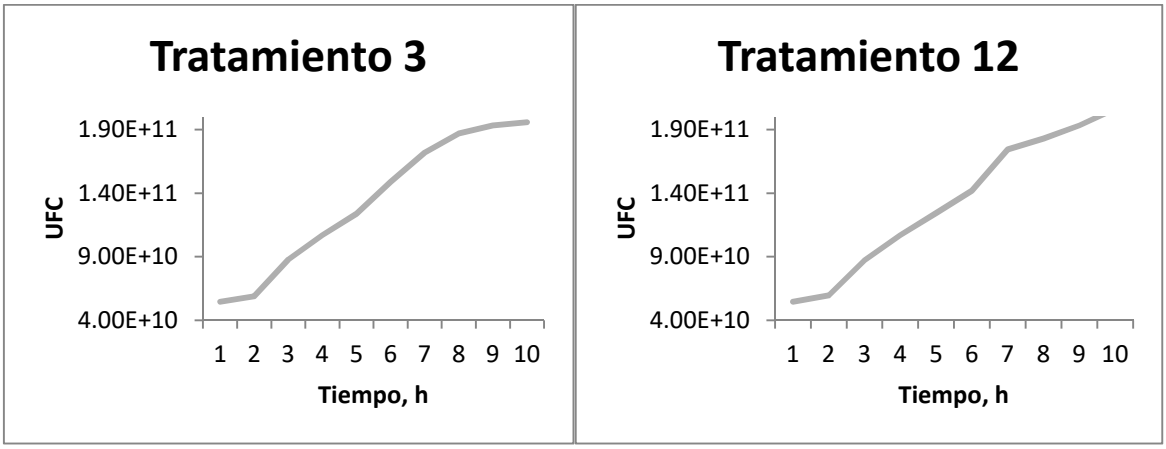
Nota: Los datos obtenidos de los tratamientos 2 y 11 se encuentran en anexos, tablas 7, 16 respectivamente

Figura 14 Graficas de Tratamientos 2 y 11

En la cinética presentada en la gráfica de ATTC de anexo, figura 23 se puede observar que la fase LAG tarda 4 horas, a diferencia de los tratamientos 2 y 11 de este trabajo en el cual la fase LAG tarda 1 hora esto debido a la disminución de concentración de extracto de levadura. Obteniendo mejores resultados que en la gráfica de ATTC de anexo, figura 23.

Tratamiento 3 y tratamiento 12

Para medios con concentraciones de Levadura de 3 g/l y de Glucosa de 10g/l la fase LAG dura 1 hora. Ver Figura 15



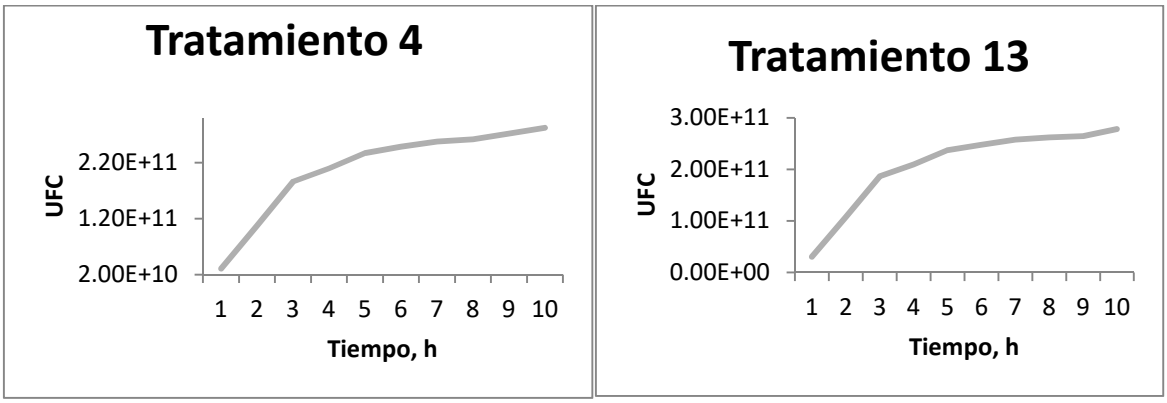
Nota: Los datos obtenidos de los tratamientos 3 y 12 se encuentran en anexos, tablas 8, 17 respectivamente

Figura 15 Graficas de Tratamientos 3 y 12

En la cinética presentada en la gráfica de ATTC de anexo, figura 23 se puede observar que la fase LAG tarda 4 horas, a diferencia de los tratamientos 3 y 12 de este trabajo en el cual la fase LAG tarda 1 hora, obteniendo mejores resultados que en la en la gráfica de ATTC de anexo, figura 23.

Tratamiento 4 y Tratamiento 13

Para medios con concentraciones de Levadura de 5 g/l y de Glucosa de 12 g/l la fase LAG es prácticamente nula alcanzando así prácticamente de inmediato la fase exponencial, esto debido a la concentración de levadura ya que esta es la principal fuente de energía que aporta a la bacteria. Ver Figura 16



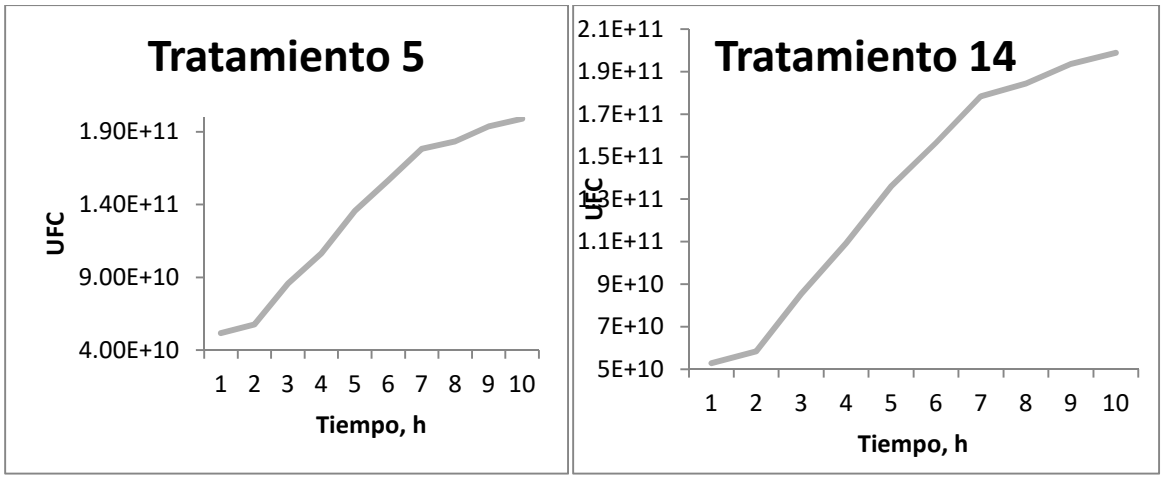
Nota: Los datos obtenidos de los tratamientos 4 y 13 se encuentran en anexos, tablas 9, 18 respectivamente

Figura 16 Graficas de Tratamientos 4 y 13

En la cinética presentada en la gráfica de ATTC de anexo, figura 23 se puede observar que la fase LAG tarda 4 horas, a diferencia de los tratamientos 4 y 13 de este trabajo en el cual la fase LAG es nula, esto como ya hemos visto se debe a la concentración de Extracto de Levadura, ya que los valores de glucosa son diferentes y se observa que se obtiene el mismo resultado que en los T1 Y T 10.

Tratamiento 5 y Tratamiento 14

Para medios con concentraciones de Levadura de 4g/l y de Glucosa de 12 g/l se ve que alcanzan la fase exponencial a las 1h. Ver Figura 17.



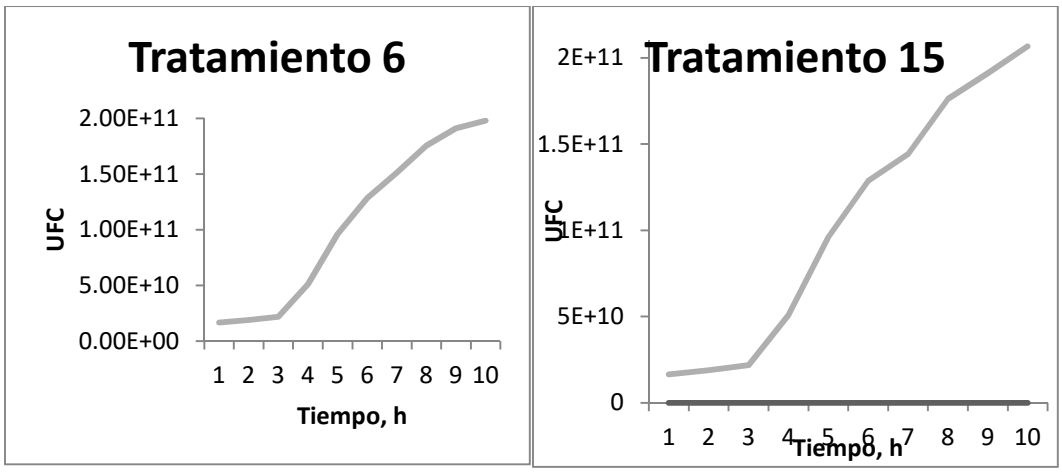
Nota: Los datos obtenidos de los tratamientos 5 y 14 se encuentran en anexos, tablas 10 y 19 respectivamente

Figura 17 Graficas de los Tratamientos 5 y 14

En la cinética presentada en la gráfica de ATTC de anexo, figura 23 se puede observar que la fase LAG tarda 4 horas, a diferencia de los tratamientos 5 y 14 de este trabajo en el cual la fase LAG tarda 1 hora, e este caso la concentración de Extracto de Levadura es menor que en los T4 Y 13.

Tratamiento 6 y Tratamiento 15

En un medio con concentraciones de Levadura de 4 g/l y de Glucosa de 8 g/l la fase LAG es de 2 horas. Ver Figura 18.



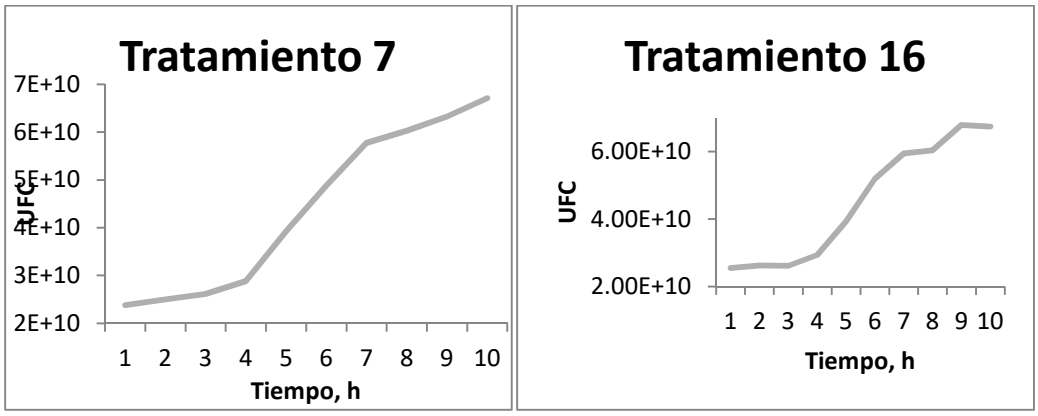
Nota: Los datos obtenidos de los tratamientos 6 y 15 se encuentran en anexos, tablas 11 y 20 respectivamente

Figura 18 Graficas de Tratamientos 6 y 15

En la cinética presentada en la gráfica de ATTC de anexo, figura 23 se puede observar que la fase LAG tarda 4 horas, en los tratamientos 6 y 15 la fase LAG también dura 2 horas se debe a la disminución de concentración de glucosa, obteniendo mejores resultados en comparación con la gráfica de ATTC de anexo, figura 23.

Tratamiento 7 y Tratamiento 16

Para medios con concentraciones de Levadura de 3 g/l y de Glucosa de 8 g/l se obtuvo una fase LAG con una duración de 3 horas, dando inicio fase exponencial tres horas después. Ver Figura 19.



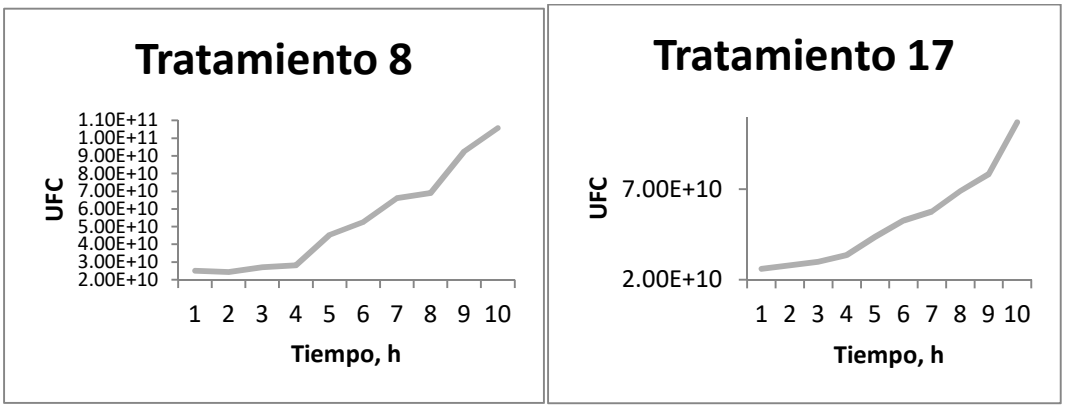
Nota: Los datos obtenidos de los tratamientos 7 y, 16 se encuentran en anexos, tablas 12 y 21 respectivamente.

Figura 19 Graficas de Tratamientos 7 y 16

En la cinética presentada en la gráfica de ATTC de anexo, figura 23 se puede observar que la fase LAG tarda 4 horas, a diferencia de los tratamientos 7 y 16 de este trabajo en el cual la fase LAG tarda 3 horas, en este caso la duración de estos tratamientos es menor, esto se debe a que la concentración de Levadura y glucosa son menores, lo cual hace que la fase LAG sea más larga que en lo tratamientos antes mencionados.

Tratamiento 8 y Tratamiento 17

Para medios con concentraciones de Levadura de 3 g/l y de Glucosa de 12 g/l se obtuvo una fase LAG con una duración de 3 horas, dando inicio fase exponencial tres horas después. Ver Figura 20



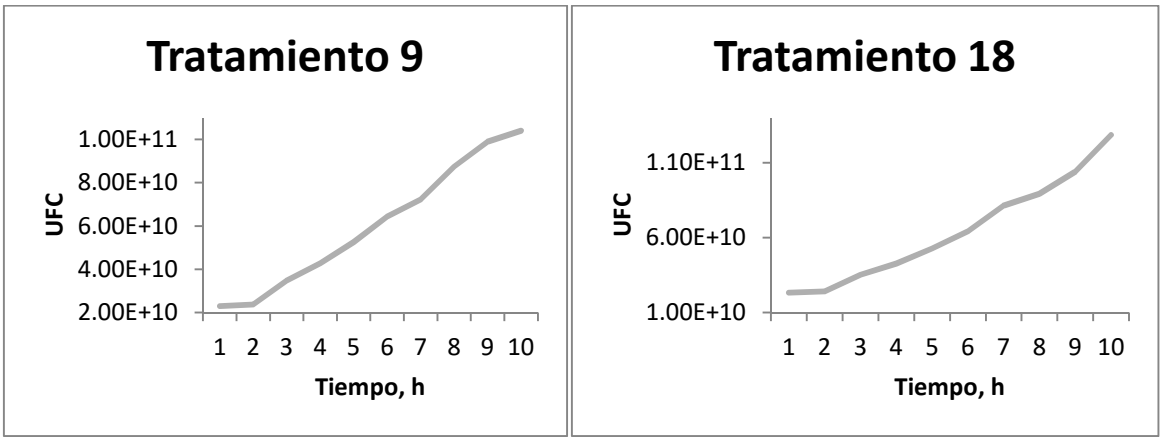
Nota: Los datos obtenidos de los tratamientos 8 y 17 se encuentran en anexos, tablas 13 y 22 respectivamente

Figura 20 Graficas de Tratamientos 8 y 17

En la cinética presentada en la gráfica de ATTC de anexo, figura 23 se puede observar que la fase LAG tarda 4 horas, a diferencia de los T8 y T17 de este trabajo en el cual la fase LAG tarda 3 hora, esto se debe a que la concentración de Extracto de Levadura es menor, aunque la concentración de glucosa es mayor, esta por sí sola no logra que la fase LAG disminuya. Obteniendo mejores resultados que en la en la gráfica de ATTC de anexo figura 23.

Tratamiento 9 y Tratamiento 18

Para medios con concentraciones de Levadura de 5 g/l y de Glucosa de 8 g/l (Tratamientos 9 y 18) se ve que alcanzan la fase exponencial a las 1h. Ver Figura 21.



Nota: Los datos obtenidos de los tratamientos 9 y 18 se encuentran en anexos, tablas 14 y 23 respectivamente

Figura 21 Graficas de Tratamientos 9 y 18

En la cinética presentada en la gráfica de ATTC de anexo, figura 23 se puede observar que la fase LAG tarda 4 horas, a diferencia de los tratamientos 9 y 18 de este trabajo en el cual la fase LAG tarda 1 hora, aunque la concentración de levadura es igual que en el T1, pero la concentración de glucosa es menor por lo que no logra igualar la fase lag. Pero aun así se logra mejores resultados que en la gráfica de ATTC de anexo, figura 23.

VII. Conclusiones

- Se caracterizó la cepa reactivada de *Azotobacter chroococcum* mediante las pruebas de Catalasa, tinción de Gram, Movilidad y oxidasa verificando que era la Cepa en cuestión.
- Se identificaron los parámetros que inciden en la velocidad de crecimiento, en este caso fueron la concentración de Extracto de Levadura y la concentración de Glucosa, a partir de los cuales se desarrollaron las corridas cinéticas.
- Se desarrollaron 18 corridas cinéticas con las diferentes concentraciones de levadura y de Glucosa, estas se obtuvieron mediante el software STAGRAFICS Centurión, a partir del cual se definieron 9 tratamientos con sus respectivas replicas, y se obtuvieron 4 tratamientos con la fase LAG nula. Ver Tabla 24 en anexos.
- Se concluye que en estos tratamientos la concentración de levadura fue de 5 g/l, valor que no cambia en ninguna de las réplicas. Por la tanto es la concentración de levadura en su valor más alto el que más incide en la disminución de la fase LAG y en la estimulación del crecimiento de la bacteria. Se realiza una nueva formulación para el medio Ashby utilizando el valor obtenido de 5 g/l para la concentración de Extracto de Levadura.
- Se evaluó nuevamente el tratamiento 1 para constatar los datos obtenidos y se verifico que efectivamente este tratamiento redujo la fase LAG a 0. Por lo tanto, se reformulo el medio de cultivo Ashby para su utilización en la cepa ATCC. Ver Anexo, Tabla 27.

VIII. Recomendaciones

Este trabajo monográfico es parte de los objetivos del proyecto titulado "Producción de Biofertilizante en Nicaragua", el cual será desarrollado en la Facultad de Ingeniería Química (FIQ), en conjunto con el Programa de Investigación, estudios nacionales y servicios ambientales (PIENSA). Utilizando *Azotobacter chroococcum* por lo tanto se recomienda a partir de los resultados de la presente investigación lo siguiente:

- Formular el medio seleccionado con melaza, caracterizando en aquellos ingenios azucareros de interés.
- En coordinación con la facultad de tecnología de la industria (FTI), la aplicación del biofertilizante en cultivos de interés nacional a nivel de viveros, con la participación de egresados de dicha facultad con el beneficio de graduarse con este tema.
- En futuros estudios se recomienda consultar a diversos campesinos sobre el uso del biofertilizante obtenido en este proyecto, así como promover con productores a nivel nacional el uso de fertilizantes biológicos, los beneficios al medio ambiente y a la producción.
- Hacer un estudio a nivel de laboratorio para determinar los parámetros de escalado y así llevar a planta piloto la producción de biofertilizante utilizando melaza nacional como medio de cultivo modificado.
- Establecer cinética de crecimiento de microorganismos aislados y purificados mediante un proceso de fermentación aerobio, con la construcción de una curva cinética bacteriana para obtener mejores parámetros tecnológicos (temperatura, tiempo de crecimiento, pH, tipo de sustrato y consumo de oxígeno disuelto).
- Formulación de cultivo a base de Ashby modificado a diferentes pH dentro del rango óptimo de las cepas purificadas de acuerdo al que reporta la literatura definida mediante un diseño de experimentos comparando con cepa patrón,
- Determinación de la mejor temperatura de crecimiento de cada cepa aislada y purificada en cultivo solido a temperaturas dentro del rango 32 y 37 °C definida mediante un diseño de experimentos comprando con cepa patrón. Estas se incuban a cada temperatura contabilizando las colonias en cada temperatura, el criterio será la mayor cantidad de colonias obtenidas.

IX. Bibliografía

1.Barrera-Cobos, O. A.-V. (20 de 10 de 2017). *El aprovechamiento del nitrógeno por la planta con tecnología* . Obtenido de El aprovechamiento del nitrógeno por la planta con tecnología : https://doi.org/10.22463/2011642X.2127

2.Bioagar. (2021). *Oxidase Reagent.*

3.Brock, T., & Madigan, M. (2015). *Microbiologia.* Madrid: Pearson.

4.Constanza, C. L. (2022). Catalisis, Enzimas y Pruebas Rapidas. 30.

5.Corrales, L. (2015). *Bacterias anaerobias: procesos que realizan y contribuyen a la sostenibilidad de la vida en el planeta.* Bogota.

6.(2015). Fertilidad de Suelos y Fertilización de Cultivos. En F. Covacevich, *Fertilidad de Suelos y Fertilización de Cultivos* (págs. 101-129). Buenos Aires.

7.Flores Rodriguez, M. (2022). *Aislamiento, conservación e identificación de microorganismos.* Guadalajara: Iteso.

8.Gaitan, & Garcia. (1998).

9.InfoAgro. (20 de 10 de 2022). *InfoAgro*. Obtenido de InfoAgro: https://www.infoagro.com/documentos/_azotobacter__y_su_aplicacion_agricultura.asp#:~:text=La%20bacteria%20Azotobacter%20chroococcum%20es,y%20sales%20inorg%C3%A1nicas%20para%20crecer.

10.López-Jácome, L. E. (2014). Las tinciones básicas en el laboratorio. *Investigacion en Discapacidad*, 9.

11.Mamani, L. A. (2018). *EFECTO DE LA APLICACIÓN DE NITRÓGENO Y Azotobacter chroococcum EN.* Peru.

12.Moreno, E. (2011). Aplciacion de Diseños Estadisticos secuenciales en la Indetificacion de fuentes nutricionales para Azotobacter chroococcum. *Revista Corpoica*.

13.Padilla Espinoza, C. (2023). *Microbiologia Fundamental.* Santiago: Editorial de Talca.

14.Perez. (1997). *Produccion de Biofertizante a partir de Azotobacter Chroococcum.* Managua.

15.Rivas Zuñiga, S. (2021). *Manual Practico de Microbiologia Basica.* UNI.Cauca.

16.Rodriguez, C. (2018). *Manual de Medios de Cultivo.* Bejucal: Biocen.

17.Rodriguez, E. (2021). *Modelo matemático de crecimiento celular que describe la dinámica de microorganismos durante la fermentación.* Durango.

18.Tovas Oviedo, J. (2017). *Microbiologia General Manual de Laboratorio.* San Luis Potosi.

19. Amato Salvador; “Síntesis de biopreparados y escalamiento de procesos biotecnológicos”

Curso Latinoamericano
Universidad Nacional de Costa Rica, 1992

20. Collins and Lyne´s; “Microbiological Methods”
6 ta edición
Butterworth, Heinemann
Oxford, Inglaterra 1991

21. Holt John G; Krieg Noel R; Sleath Peter H. A; Staley James T; William Stanley T; “bergey´s Manual of determinative Bacteriology”
9 na edition
Sans Tache Edition
Maryland, USA 1994

X. Anexo

10.1. Tinción de Gram (López-Jácome, 2014)

- Se Prepara frotis delgado se seca al aire y fija con calor.
- Colocar sobre cada muestra cristal violeta por 1 minuto.
- Enjuagar con agua destilada.
- Colocar una solución de yodo por 1 minuto. Enjuagar nuevamente.
- Aplicar lentamente el reactivo de alcohol y seguir agregando el decolorante hasta que la tintura ya no fluya.
- Lavar inmediatamente.
- Cubrir el frotis con safranina durante 1 minuto.
- Enjuagar y dejar secar el aire.
- Observar cada frotis al microscopio.

10.2. Pasos para realizar una siembra por vertido en placa (Tovas Oviedo, 2017)

- Se pipetea un volumen conocido en una placa estéril.
- Se mezcla el medio de cultivo estéril y se mezcla con el inoculo.
- Se incuba el inoculo.

10.3. Prueba de Catalasa (Constanza, 2022)

- Se selecciona una azada del cultivo de interés.
- Agregar una gota de peróxido de hidrógeno (H_2O_2), al 30%.
- Observar la efervescencia; prueba confirmativa de catalasa.

10.4. Técnica de placa estriada (Rodriguez C. , 2018)

- Tomar una asada del cultivo empleando la técnica aséptica.
- Transferir el inoculo en un área pequeña de la superficie de la placa próxima al borde y luego extenderla formando estrías muy juntas y paralelas que cubran aproximadamente la cuarta parte de placa.
- Bajar la cubierta de la placa y flamear el asa de inocular.
- Rozar una vez la superficie del conjunto original de estrías con el asa de inocular deslizar y realizar en una parte virgen de la placa una segunda tanda de estrías evitando que este toque el primer grupo de estrías.

- Esterilizar el asa y enfriar. Repetir la operación anterior, pero rozando al empezar la segunda tanda de estrías.
- Esterilizar el asa y cerrar la placa e incubar.

10.5. Prueba de Oxidación (Bioagar, 2021)

- Agregar una porción del cultivo en la zona del papel de la tira de diagnóstico.
- Leer resultado de después de un minuto.
  Interpretación de los resultados.
  Negativa: no desarrolla ningún cambio de color.
  Positiva: se desarrolla una mancha azul oscuro o negra en la posición de la colonia eliminada.

10.6. Prueba de Movilidad (Constanza, 2022)

- Colocar una gota de cultivo inoculado con la bacteria en el centro de un cubreobjeto.
- Colocar una gota de agua estéril en cada esquina del cubreobjeto.
- Invertir el cubreobjeto sobre un portaobjeto con depresión central.
- Al invertir el cubreobjeto y adherirse al portaobjeto, la gota de cultivo quedara suspendida.
- Colocar en el microscopio.

10.7. Tablas y Graficas

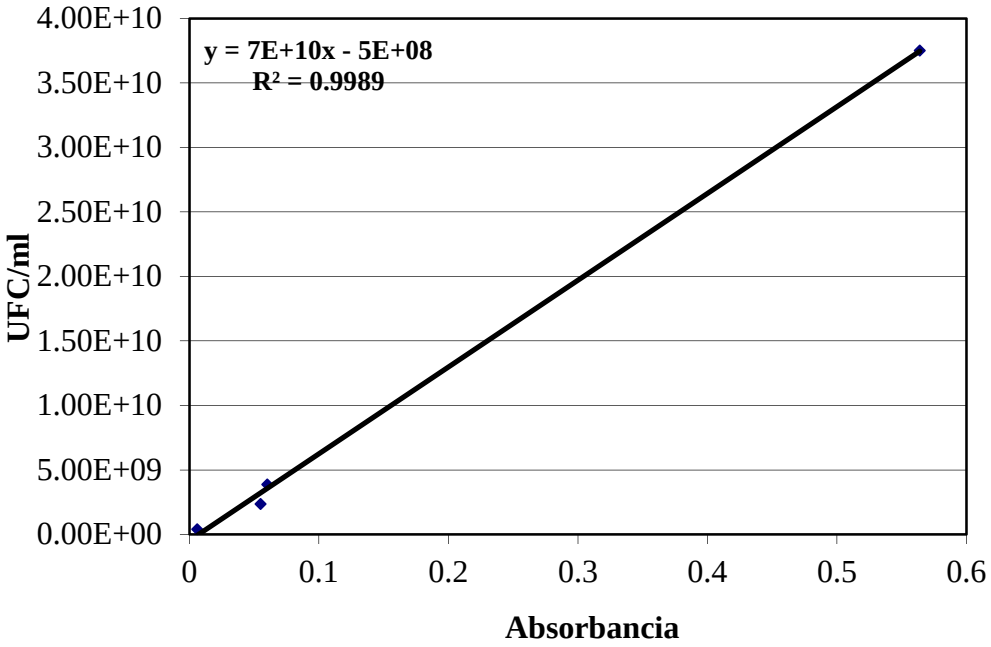


Figura 22. Curva de Calibración (Perez, 1997)

Dónde:

Y: número de UFC
X: Absorbancia.
Este modelo obtuvo un coeficiente de correlación ≥ 0.97.

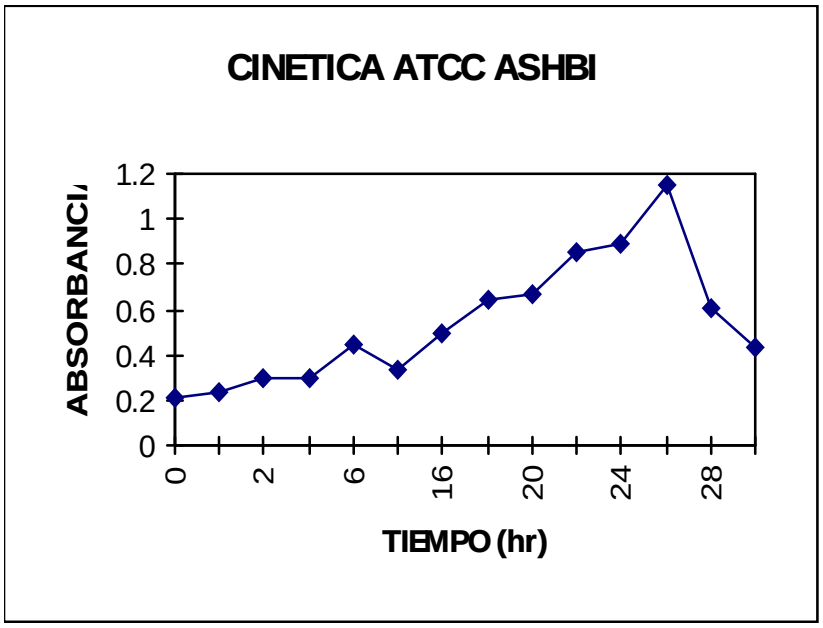


Figura 23. Cinética ATTC (Pérez, 1997)

Tabla 6. Datos del Tratamiento 1

Tiempo	ABS	UFC
1	1.24035	8.65E+10
2	1.71455	1.20E+11
3	2.1563	1.51E+11
4	2.4227	1.69E+11
5	2.6297	1.84E+11
6	2.70765	1.89E+11
7	2.751	1.92E+11
8	2.8156	1.97E+11
9	2.84545	1.99E+11
10	2.8631	2.00E+11

Tabla 7. Datos del Tratamiento 2

Tiempo	ABS	UFC
1	0.116695	7.87E+09
2	0.214905	1.47E+10
3	0.57467	3.99E+10
4	0.942485	6.57E+10
5	1.4279	9.97E+10
6	1.7375	1.21E+11
7	2.09395	1.46E+11
8	2.47075	1.73E+11
9	2.71725	1.90E+11
10	2.904	2.03E+11

Tabla 8. Datos del Tratamiento 3

Tiempo	ABS	UFC
1	0.781635	5.44E+10
2	0.84361	5.88E+10
3	1.25975	8.79E+10
4	1.5319	1.07E+11
5	1.7737	1.24E+11
6	2.1317	1.49E+11
7	2.45965	1.72E+11
8	2.67695	1.87E+11
9	2.76445	1.93E+11
10	2.803	1.96E+11

Tabla 9. Datos del Tratamiento 4

Tiempo	ABS	UFC
1	0.4422	3.07E+10
2	1.5373	1.07E+11
3	2.66453	1.86E+11
4	2.99635	2.09E+11
5	3.3945	2.37E+11
6	3.55125	2.48E+11
7	3.6865	2.58E+11
8	3.7411	2.62E+11
9	3.8898	2.72E+11
10	4.03845	2.82E+11

Tabla 10. Datos del Tratamiento 5

Tiempo	ABS	UFC
1	0.742941	5.17E+10
2	0. 826971	5.76E+10
3	1.23055	8.58E+10
4	1.52589	1.07E+11
5	1.941313	1.36E+11
6	2.24063	1.57E+11
7	2.55174	1.78E+11
8	2.62339	1.83E+11
9	2.771863	1.94E+11
10	2.848455	1.99E+11

Tabla 11. Datos del Tratamiento 6

Tiempo	ABS	UFC
1	0.23952	1.65E+10
2	0.274065	1.89E+10
3	0.314685	2.17E+10
4	0.731995	5.09E+10
5	1.37545	9.60E+10
6	1.8402	1.29E+11
7	2.1643	1.51E+11
8	2.51265	1.76E+11
9	2.73415	1.91E+11
10	2.8319	1.98E+11

Tabla 12. Datos del Tratamiento 7

Tiempo	ABS	UFC
1	0.34378	2.38E+10
2	0.361875	2.50E+10
3	0.37747	2.61E+10
4	0.41551	2.88E+10
5	0.565615	3.93E+10
6	0.702245	4.89E+10
7	0.82932	5.78E+10
8	0.86582	6.03E+10
9	0.907335	6.32E+10
10	0.96252	6.71E+10

Tabla 13. Datos del Tratamiento 8

Tiempo	ABS	UFC
1	0.361495	2.50E+10
2	0.3525	2.44E+10
3	0.389825	2.70E+10
4	0.40618	2.81E+10
5	0.65285	4.54E+10
6	0.7542	5.25E+10
7	0.949415	6.62E+10
8	0.990885	6.91E+10
9	1.32487	9.24E+10
10	1.5155	1.06E+11

Tabla 14. Datos del Tratamiento 9

Tiempo	ABS	UFC
1	0.331925	2.29E+10
2	0.34392	2.38E+10
3	0.500585	3.47E+10
4	0.61557	4.28E+10
5	0.75427	5.25E+10
6	0.92327	6.43E+10
7	1.0359	7.22E+10
8	1.25405	8.75E+10
9	1.4179	9.90E+10
10	1.48975	1.04E+11

Tabla 15. Datos del Tratamiento 10

Tiempo	ABS	UFC
1	1.25415	8.75E+10
2	1.85805	1.30E+11
3	2.15395	1.50E+11
4	2.42255	1.69E+11
5	2.59535	1.81E+11
6	2.7164	1.90E+11
7	2.75425	1.92E+11
8	2.81885	1.97E+11
9	2.8563	2.00E+11
10	2.889	2.02E+11

Tabla 16. Datos del Tratamiento 11

Tiempo	ABS	UFC
1	0.116645	7.87E+09
2	0.21419	1.47E+10
3	0.574165	3.99E+10
4	0.943685	6.58E+10
5	1.4279	9.97E+10
6	1.7272	1.21E+11
7	2.34395	1.64E+11
8	2.47075	1.73E+11
9	2.56755	1.79E+11
10	2.9538	2.06E+11

Tabla 17. Datos del Tratamiento 12

Tiempo	ABS	UFC
1	0.78285	5.45E+10
2	0.853605	5.95E+10
3	1.24975	8.72E+10
4	1.53105	1.07E+11
5	1.7787	1.24E+11
6	2.0322	1.42E+11
7	2.49465	1.74E+11
8	2.6171	1.83E+11
9	2.76445	1.93E+11
10	2.953	2.06E+11

Tabla 18. Datos del Tratamiento 13

Tiempo	ABS	UFC
1	0.44055	3.05E+10
2	1.53945	1.07E+11
3	2.6657	1.86E+11
4	2.9967	2.09E+11
5	3.39415	2.37E+11
6	3.5418	2.48E+11
7	3.6856	2.58E+11
8	3.74375	2.62E+11
9	3.7798	2.64E+11
10	3.98055	2.78E+11

Tabla 19. Datos del Tratamiento 14

Tiempo	ABS	UFC
1	0.759	5.28E+10
2	0.8392	5.84E+10
3	1.225	8.55E+10
4	1.56589	1.09E+11
5	1.9494	1.36E+11
6	2.24095	1.57E+11
7	2.5525	1.78E+11
8	2.63875	1.84E+11
9	2.7706	1.94E+11
10	2.8456	1.99E+11

Tabla 20. Datos del Tratamiento 15

Tiempo	ABS	UFC
1	0.24046	1.65E+10
2	0.27501	1.90E+10
3	0.31685	2.19E+10
4	0.73101	5.09E+10
5	1.37695	9.61E+10
6	1.8402	1.29E+11
7	2.0643	1.44E+11
8	2.5222	1.76E+11
9	2.73375	1.91E+11
10	2.9569	2.07E+11

Tabla 21. Datos del Tratamiento 16

Tiempo	ABS	UFC
1	0.368785	2.55E+10
2	0.37895	2.62E+10
3	0.37747	2.61E+10
4	0.42355	2.93E+10
5	0.56615	3.93E+10
6	0.746245	5.19E+10
7	0.853375	5.94E+10
8	0.8662	6.03E+10
9	0.97335	6.78E+10
10	0.9667	6.74E+10

Tabla 22. Datos del Tratamiento 17

Tiempo	ABS	UFC
1	0.3768	2.61E+10
2	0.405145	2.81E+10
3	0.43325	3.00E+10
4	0.4848	3.36E+10
5	0.62935	4.38E+10
6	0.7587	5.28E+10
7	0.827415	5.76E+10
8	0.98885	6.89E+10
9	1.1237	7.84E+10
10	1.53315	1.07E+11

Tabla 23. Datos del Tratamiento 18

Tiempo	ABS	UFC
9	0.33575	2.32E+10
10	0.3492	2.41E+10
11	0.50785	3.52E+10
12	0.6147	4.27E+10
13	0.7577	5.27E+10
14	0.9227	6.43E+10
15	1.1659	8.13E+10
16	1.27905	8.92E+10
17	1.48835	1.04E+11
18	1.83975	1.28E+11

Tabla 24. Duración de FASE LAG

No. de Tratamiento	Concentración de Levadura [g/l]	Concentración de Glucosa [g/l]	Duración de Fase LAG (H)
1	5	10	0
2	4	10	1
3	3	10	1
4	5	12	0
5	4	12	1
6	4	8	2
7	3	8	3
8	3	12	3
9	5	8	1
10	5	10	0
11	4	10	1
12	3	10	1
13	5	12	0
14	4	12	1
15	4	8	2
16	3	8	3
17	3	12	3
18	5	8	1

Tabla 25. Contenido Químico del medio de cultivo para conservación *(Perez, 1997)*

Compuesto	Concentración
Glucosa	$10\,g\ /l$
Manitol	$10\,g\ /l$
KH_2P_4	$1\,g\ /l$
$NaNO_3$	$2.36\,g\ /l$
$MgSO_4 * 7H_2O$	$0.2\,g\ /l$
$CaCl_2$	$0.13\,g\ /l$
$FeSO_4 * 7H_2O$	$0.1\,g\ /l$
$MnSO_4 * 2H_2O$	$0.01\,g\ /l$
$Na_2MoO_4 * 2H_2O$	$0.0015\,g\ /l$
Extracto de levadura	$4\,g\ /l$
Agar	$20\,g\ /l$

Tabla 26. Contenido Químico del medio de cultivo Ashby modificado para conteo en placas *(Perez, 1997)*

Compuesto	Concentración
Glucosa	$10\,g\ /l$
Manitol	$10\,g\ /l$
KH_2P_4	$0.5\,g\ /l$
$MgSO_4 * 7H_2O$	$0.2\,g\ /l$
$NaCl_2$	$0.2\,g\ /l$
$CaSO_4 * 7H_2O$	$0.1\,g\ /l$
$CaCO_3$	$5\,g\ /l$
$FeCl_3$	Trazas
$MnSO_4 * 2H_2O$	Trazas
$NaMoO_4 * 2H_2O$	Trazas
Extracto de levadura	$4\,g\ /l$
Agar	$20\,g\ /l$

Tabla 27 Contenido Químico del medio liquido de cultivo Ashby modificado en cantidad de Extracto de Levadura

Compuesto	Concentración
Glucosa	$10\,g\ /l$
Manitol	$10\,g\ /l$
KH_2P_4	$0.5\,g\ /l$
$MS_4 * 7H_2O$	$0.2\,g\ /l$
NC_2	$0.2\,g\ /l$
$CS_4 * 7H_2O$	$0.1\,g\ /l$
CC_3	$5\,g\ /l$
FC_3	Trazas
$MS_4 * 2H_2$	Trazas
$NM_4 * 2H_2O$	Trazas
Extracto de levadura	$5\,g\ /l$