

**ESTANDARIZACIÓN DE UN MEDIO DE CULTIVO COMPLEJO PARA LA
MULTIPLICACIÓN DE LA CEPA C50 DE *Rhizobium* sp.**



DANIEL FERNANDO ROJAS TAPIAS

TRABAJO DE GRADO

Presentado como requisito para optar al título de

Microbiólogo Industrial

**PONTIFICIA UNIVERSIDAD JAVERIANA
FACULTAD DE CIENCIAS
CARRERA DE MICROBIOLOGÍA INDUSTRIAL
BOGOTÁ, D.C. 2008**

NOTA DE ADVERTENCIA

Artículo 23 de la resolución N° 13 de Julio de 1946.

“La universidad no se hace responsable por los conceptos emitidos por sus alumnos en sus trabajos de tesis. Sólo velará porque no publique nada contrario al dogma y a la moral Católica y porque las tesis no contengan ataques personales contra persona alguna, antes bien se vea en ellas el anhelo de buscar la verdad y la justicia”.

**ESTANDARIZACIÓN DE UN MEDIO DE CULTIVO COMPLEJO PARA LA
MULTIPLICACIÓN DE LA CEPA C50 DE *Rhizobium* sp.**



DANIEL FERNANDO ROJAS TAPIAS

APROBADO

María Fernanda Garrido M.Sc.
Directora

Ruth Bonilla Buitrago Ph.D.
Codirectora

Ivonne Gutiérrez M.Sc.
Jurado

Nelson Valero M.Sc.
Jurado

**ESTANDARIZACIÓN DE UN MEDIO DE CULTIVO COMPLEJO PARA LA
MULTIPLICACIÓN DE LA CEPA C50 DE *Rhizobium* sp.**



DANIEL FERNANDO ROJAS TAPIAS

APROBADO

Ingrid Schuler Ph.D.

Decana Académica

Janeth Arias M.Sc, M.Ed.

Directora de Carrera

DEDICATORIA

A DIOS PORQUE ME PERMITIÓ SEGUIR ADELANTE Y VENCER TODOS LOS OBSTÁCULOS QUE EN EL CAMINO SE PRESENTARON, A MIS PADRES Y A MI HERMANO QUE SIEMPRE ESTÁN ALLÍ PARA DARME SU APOYO Y MOTIVARME A SEGUIR ADELANTE CON TODOS LOS PROYECTOS QUE DESEO REALIZAR Y A MI FAMILIA Y A MIS AMIGOS POR SU AMISTAD INCONDICIONAL.

AGRADECIMIENTOS

A María Fernanda Garrido y la Dra. Ruth Bonilla. Laboratorio de Microbiología de Suelos. Corpoica – C.I. Tibaitatá por su gestión en el desarrollo de este trabajo de grado.

A mis amigos en Corpoica – C.I. Tibaitatá por su constante apoyo. A la delegación de la Javeriana y a la de Cúcuta, y en especial al Microbiólogo Industrial Mauricio Camelo Rusinque.

A Consuelo Rodríguez e Inés Roldán por su ayuda constante e incansable durante todo el desarrollo del trabajo de grado.

A mis amigos: el “parche de la 80”, por su gran amistad.

A mis Padres y a mi Hermano que son la razón de mí vivir.

Tabla de contenido

Resumen.....	16
Abstract.....	17
Introducción.....	18
Planteamiento del Problema y Justificación.....	20
Objetivos	23
Objetivo general.....	23
Objetivos específicos	23
Marco Teórico	24
1. Sistema silvopastoril	24
2. Fijación biológica de nitrógeno	25
3. Organismos fijadores de nitrógeno	26
3.2 Simbiosis asociativas.....	27
3.3 Bacterias de vida libre	27
4. La nitrogenasa.....	28
4.1 Nomenclatura.....	28
4.2 El complejo enzimático	28
4.3 Modo de acción de la nitrogenasa.....	29
4.4 Sustratos para la nitrogenasa.....	29
5. Simbiosis leguminosa – rizobio.....	30
5.1 Las leguminosas.....	30
5.1.1.2 Hábitat.....	31
5.1.1.3 Crecimiento	31
5.2 Los rizobios.....	31
5.2.1. Rhizobium sp.....	32

5.2.1.1 Descripción microscópica y macroscópica	32
5.2.1.2 Metabolismo	32
5.2.1.3 Genética.....	34
5.3 La simbiosis	35
5.4 Algunos reportes	37
6. Inoculantes rizobianos.....	38
6.1 Calidad en inoculantes rizobianos.....	39
6.2 Ventajas de la fertilización con rizobios	39
7. Banco de cepas.....	40
7.1 Criopreservación.....	40
7.1.1 Tipo de unidades de cristalización desarrolladas	41
7.1.2 Cantidad de hielo formado.....	41
7.1.3 Velocidad de congelamiento	42
7.1.4 Consecuencias del congelamiento de las células	42
7.1.5 Glicerol como agente crioprotector	42
8. Medios de cultivo.....	43
8.1 Clasificación de los medios de cultivo según su composición	43
8.2 Nutrición microbiana.....	43
8.2.1 Carbono y nitrógeno	43
8.2.2 Otros macronutrientes: P, S, K, Mg, Ca, Na.....	45
8.2.3 Micronutrientes: elementos traza	45
8.2.4 Factores de crecimiento	46
8.3 Materias primas.....	47
8.4 Formulación	47
9. Diseño de experimentos	48

9.1 Directrices para el diseño de experimentos	48
9.2 Selección del diseño experimental	49
9.3 Diseños experimentales	49
9.3.1 Diseños de resolución III	49
9.3.2 Diseños de resolución IV	50
9.3.3 Diseños de superficie de respuesta: Box-Behnken.....	50
Metodología.....	52
1. Cepas de estudio	52
1.1 Reactivación del inóculo y medio de cultivo.....	52
2. Estandarización del inóculo.....	52
2.1 Curva de peso seco.....	52
2.2 Cinética Preliminar de Crecimiento del Microorganismo.....	53
2.3 Generación de la Colección de Trabajo.....	53
2.4 Estandarización del inóculo para los ensayos del medio de cultivo	54
3. Fuentes de crecimiento.....	54
3.1 Obtención de las fuentes de crecimiento	54
3.2 Cálculo del carbono total y nitrógeno total en las fuentes de crecimiento	55
4. Screening primario	55
5. Screening Secundario y Selección de fuentes	56
5.2 Screening secundario II	57
6. Diseño de optimización: Box – Behnken	57
7. Comparación de la cinética de crecimiento en los medios de cultivo tradicional y alterno	58
8. Prueba de estabilidad acelerada –preliminar- en turba.....	58

9. Evaluación del medio alterno sobre el crecimiento de otras cepas de rizobios	59
9.1 Evaluación del crecimiento de la cepa T14 de Rhizobium sp. sobre el medio alterno.	59
9.2 Evaluación del crecimiento de las cepa C2 y la J01 de Bradyrhizobium sp. sobre el medio alterno	59
10. Análisis de costos.....	59
11. Software.....	59
Resultados y Discusión.....	61
1. Descripción fenotípica de las cepas empleadas	61
2. Estandarización del inóculo.....	62
2.1 Curva de peso seco.....	62
2.2 Curva preliminar de crecimiento del microorganismo.....	63
2.3 Colección de Trabajo.....	66
3. Sustratos	67
3.1 Determinación del contenido de carbono y nitrógeno total en las fuentes de crecimiento.....	67
4. Screening primario – SP-.....	68
5. Screening secundario y selección de factores.....	70
5.1 Screening secundario I – SSI-.....	70
5.2. Screening secundario II – SSII-	73
6. Diseño de optimización de la respuesta: Box Behnken – BB-.....	75
7. Comparación de la cinética de crecimiento en los medios de cultivo tradicional y alterno	80
8. Pruebas de estabilidad acelerada –preliminar- en turba	86

9. Evaluación del medio alterno sobre el crecimiento de otras cepas de rizobios	88
10. Análisis de costos.....	89
Conclusiones	91
Recomendaciones	92
Bibliografía.....	93
Anexos	101
Anexo 1. Curva de peso seco	101
Masa de los tubos vacíos.....	101
Anexo 2. Curva de crecimiento preliminar	103
Anexo 3. Linealización de la fase exponencial en la cinética preliminar de crecimiento.	104
Anexo 4. Estabilidad de la cepa en crioconservación.....	105
Anexo 5. Plackett - Burman	106
Anexo 6. – Screening secundario I.....	108
Anexo 7. Screening primario II	110
Anexo 8. Box–Behnken	112
Anexo 9. Linealización de la fase exponencial de crecimiento en el medio – LM-	114
Anexo 10. Linealización de las fases exponenciales de crecimiento en el medio alterno.....	115
Anexo 11. Estabilidad de la cepa C50 en turba.....	118
Comparación de la estabilidad en el medio inoculado con el medio alterno vs. el tradicional:.....	118
Anexo 12. Crecimiento de las cepas de rizobios sobre el medio de cultivo alterno.....	120

1. Estadística sobre la cepa J01.....	120
2. Estadística sobre la cepa C2	120
3. Estadística sobre la cepa T14.....	121
4. Estadística sobre la cepa C50	122

Índice de Figuras

Figura 1. Diseño Box – Behnken.....	45
Figura 2. Curva de peso seco para <i>Rhizobium</i> sp. cepa C 50.....	57
Figura 3. Curva de crecimiento de <i>Rhizobium</i> sp. cepa C 50.....	58
Figura 4. Tiempo vs. Ln(X/Xo) y ecuación de regresión lineal.....	59
Figura 5. Viabilidad celular posterior a la crioconservación.....	60
Figura 6. Gráfico de superficie de respuesta entre las variables glutamato y extracto de levadura.....	73
Figura 7. Gráfico de superficie de respuesta entre las variables melaza y glutamato.....	73
Figura 8. Gráfico de superficie de respuesta entre las variables extracto de levadura y melaza.....	74
Figura 9. Cinética de crecimiento de la cepa C50 de <i>Rhizobium</i> sp. en medio tradicional y en medio alterno.....	77
Figura 10. Linealización de la fase exponencial en el medio –LM-.....	78
Figura 11. Linealización de la fase exponencial en el medio –DR-.....	78
Figura 12. Linealización de la primera parte de la fase exponencial en medio –DR-.....	80
Figura 13. Linealización de la segunda parte de la fase exponencial en medio –DR-.....	80
Figura 14. Estabilidad de los microorganismos en el soporte con el medio de cultivo tradicional y el alterno.....	82
Figura 15. Crecimiento de las cepas J01, C2 y T14 sobre el medio alterno y el tradicional.....	83

Índice de Tablas

Tabla 1. Metabolismo de algunas fuentes de crecimiento por algunas especies de Rhizobium.....	27
Tabla 2. Micronutrientes en la naturaleza y en los medios de cultivo.....	38
Tabla 3. Micronutrientes (elementos trazas) necesarios para organismos vivos.....	40
Tabla 4. Cofactores enzimáticos y vitaminas.....	41
Tabla 5. Diseño del Experimento Plackett-Burman.....	49
Tabla 6. Experimento de Plackett-Burman: niveles factor.....	50
Tabla 7. Descripción microscópica de las cepas de rizobios.....	55
Tabla 8. Descripción macroscópica de las cepas de rizobios en medio –LM- + azul de bromotimol.....	55
Tabla 9. Descripción macroscópica de las cepas de rizobios en medio –LM- + azul de bromotimol.....	55
Tabla 10. Parámetros cinéticos.....	59
Tabla 11. Carbono y nitrógeno total. Relación carbono-nitrógeno (C/N) de los sustratos empleados.....	61
Tabla 12. Experimento de Plackett-Burman y resultados con niveles factor.....	62
Tabla 13. Efectos y análisis de variables por método estadístico.....	63
Tabla 14. Diseño factorial fraccionado y resultados con niveles factor.....	65
Tabla 15. Efectos y análisis de variables por método estadístico.....	66
Tabla 16. Diseño Factorial Fraccionado saturado de ½ y un punto central, y resultados con niveles factor.....	67
Tabla 17. Efectos y análisis de variables por método estadístico.....	68
Tabla 18. Diseño de superficie de respuesta: Box Behnken y resultados con niveles factor.....	69

Tabla 19. Efectos y análisis de variables por método estadístico.....	70
Tabla 20. Medio de cultivo complejo propuesto: -DR-.....	74
Tabla 21. Parámetros cinéticos en ambos medio de cultivo.....	79
Tabla 22. Parámetros cinéticos: Medio -DR-.....	80
Tabla 23. Matriz de costos del medio -LM-.....	84
Tabla 24. Matriz de costos del medio alternativo.....	84

Resumen

El uso estadístico de diseños experimentales de forma secuencial (Plackett-Burman, factorial y superficie de respuesta) permitieron estandarizar un medio de cultivo para la multiplicación de la cepa C50 de *Rhizobium* sp. De un total de ocho factores, cinco fueron seleccionados por criterios de costo económico y disponibilidad, y de éstos, tres mostraron influir de forma estadísticamente sobre el desarrollo de la cepa. La composición optimizada del medio alterno –DR- fue en g/L: glicerol 1.89, melaza 0.67, glutamato 0.90, extracto de levadura 0.60 y sales 0.10. No se presentaron diferencias estadísticamente significativas ($p>0.05$) cuando se comparó el crecimiento de la cepa C50 en éste medio y el tradicional –LM-. Por otra parte, no se presentaron diferencias significativas ($p>0.05$) en la viabilidad de la cepa crecida tanto en el medio –LM- como en el –DR- cuando se inoculó sobre un soporte no inerte: turba, y el inoculante se conservó bajo refrigeración durante 30 días. Las cepas J01, T14 y C2 mostraron ser aptas para crecer sobre el medio alterno; no se presentaron diferencias significativas ($p>0.05$) entre los recuentos para las dos primeras, mientras que C2 mostró crecer mejor en el medio –DR- ($p<0.05$).

Palabras clave: *Rhizobium* sp., diseño Plackett-Burman, diseños factoriales, diseño Box-Behnken.

Abstract

The sequential statistical use of experimental designs (P-B, factorial and response surface designs) allowed to standardize a culture media for the multiplication of the strain C50 of *Rhizobium* sp. From a total of eight factors, five of them were selected by economical costs and availability criteria, and from these, three factors statically influence the growth of the strain. The optimized composition of the alternative culture media –DR- was g/L: glycerol 1.89, molasses 0.67, glutamate 0.90, yeast extract 0.60 and salts 0.10. It was not significant statically differences ($p>0.05$) when was compared the growth of the strain C50 neither in this culture media and neither in the traditional one. In the other hand, there was not significant statically differences in the viability of the microorganism grown in the two culture media, when they were inoculated in a solid support: peat, and the inoculants were conserved under refrigeration conditions during 30 days. The strains J01, T14 and C2 showed to be suitable to grow in the alternative culture media; it was not presented significant differences ($p>0.05$) between the counts for J01 and T14, meanwhile C2 showed a better growth in the culture media –DR- ($p<0.05$)

Key words: *Rhizobium* sp., Plackett-Burman design, factorial design, Box-Behnken design.

Introducción

En suelos tropicales, el elemento más limitante en el desarrollo de las plantas es el nitrógeno (Franco y Dobereiner, 1994), para solucionar este problema los productores del sector agropecuario utilizan indiscriminadamente fertilizantes de síntesis química con el objetivo de mejorar la calidad de sus cultivos o del forraje (Marín *et al.*, 2003), sin embargo ésta es costosa y poco amigable con el medio ambiente, provocando así contaminación de aguas subterráneas, eutroficación, erosión y en general, cambios en la estructura físico-química del suelo además de una drástica disminución en la biota del suelo (Justic *et al.*, 1995; Rabalais *et al.*, 1996, Tejada *et al.*, 2005). Dentro del concepto de agricultura sostenible surgen tecnologías limpias como es la biofertilización con bacterias diazótroficas, es decir fijadoras de nitrógeno, esta práctica se ve como una alternativa segura, efectiva y sobre todo económica para asegurar y recuperar la productividad de los suelos; se ha demostrado que microorganismos fijadores de nitrógeno pueden desempeñar otras funciones o beneficios como la síntesis de fitohormonas o la solubilización de fósforo, que contribuyen así con el aumento del rendimiento en los cultivos (Mahecha, 2002; Sylvia *et al.*, 2005).

En términos generales se puede afirmar que la ganadería del trópico bajo Colombiano ha evolucionado al margen de la modernización, predominando sistemas de producción intensivos caracterizados por una baja eficiencia en el uso del suelo, la marcada estacionalidad de la zona, sumado a un gran deterioro ambiental especialmente del recurso suelo, atribuido a la deforestación, las quemadas, la erosión y la pérdida de la biodiversidad; así mismo, la falta de oportunidades en zonas rurales se evidencia en la inequidad socioeconómica con respecto a las áreas urbanas. El presente trabajo de grado se encuentra enmarcado dentro del proyecto “Producción de un fertilizante biológico mixto con base en bacterias fijadoras de nitrógeno para sistemas silvopastoriles de la Zona Caribe Colombiana” financiado por el Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural (MADR), la Cooperativa Integral Lechera del Cesar (COOLESAR) y la Gobernación del Cesar, cuyo objetivo es contribuir a reducir la situación anteriormente descrita y recuperar la capacidad productiva de los suelos, lo cual presenta gran interés teniendo en cuenta que los sistemas ganaderos ocupan

alrededor del 60% del área total del Caribe seco colombiano. Una alternativa ecológica, que combina tanto la recuperación del ecosistema suelo, como su adecuado manejo es la implementación de sistemas de producción tipo silvopastoril. Por consiguiente, obtener mediante la investigación inoculantes de excelente calidad de forma económica contribuirá a la masificación de productos biológicos amigables con el medio ambiente que permitan aumentar la producción ganadera en esta región del país y por consiguiente mejoren la calidad de vida de los productores.

El objetivo principal de este estudio, fue la estandarización de un medio de cultivo complejo haciendo uso de productos y subproductos agroindustriales para la multiplicación de la cepa C50 de *Rhizobium* sp., la cual es capaz de nodular la leguminosa forrajera *Leucaena leucocephala*, logrando así una disminución en los costos de producción, ya que hasta la actualidad, el crecimiento de rizobios en la Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria –Corpoica-, se ha venido realizando en el medio de cultivo –LM- (Levadura – Manitol) el cual es costoso debido al uso de reactivos químicos analíticos. Esto generará mayor rentabilidad en la producción de un biofertilizante con base en estos microorganismos, debido a la utilización de insumos agrícolas y subproductos agroindustriales como fuentes de energía y nutrientes para el crecimiento de las bacterias, contribuyendo además a la disminución del impacto ambiental generado por algunos de ellos. Algunos de los reportes donde se han utilizado subproductos con este fin y se han obtenido resultados importantes son: Bissonnette (1986), Maede *et al* (1985), Jain *et al* (2000), Rebah *et al.*, (2007).

Planteamiento del Problema y Justificación

En Colombia, la superficie total agropecuaria está estimada en aproximadamente 50 millones de hectáreas de las cuales el renglón pecuario ocupa casi el 75%. La mayor parte del área pecuaria está dedicada a pastos para la ganadería bovina (aproximadamente 80%) manejada en un 70% bajo sistemas de producción intensivos. Aproximadamente, la región Caribe colombiana posee 3.3 millones de hectáreas en pastos y una población bovina de 6.9 millones de bovinos, que generan el 38.7% de la leche y el 38% de la carne que produce el país (Cuesta, 2005). En la actualidad, el departamento del Cesar es uno de los principales departamentos ganaderos de la Costa Caribe, con un hato cercano a 1.5 millones de cabezas, las cuales representan casi el 6% del hato colombiano y el 20% de la región (Gamarra, 2005).

El departamento del Cesar, está situado al norte del país, en la llanura del Caribe, posee una mezcla de climas y pisos térmicos que van desde el cálido con temperaturas superiores a los 28°C hasta el páramo alto con temperaturas inferiores a los 4°C. Administrativamente, tiene 25 municipios los cuales se encuentran divididos en cuatro sub-regiones. El conjunto de sus municipios constituye una importante cuenca ganadera productora de leche (Cuesta, 2005).

En el país la producción de leche tiene un importante porcentaje en el sector agropecuario nacional, en 2004 tuvo una participación del 12%. En el año 2005, el DANE estimó la producción en 6.024 millones de litros, con un promedio diario por vaca de 4.47 litros, lo cual es considerablemente menor a la producción en países como Argentina y Uruguay donde el rendimiento por vaca es de 13 litros/día y aún más en Estados Unidos donde la producción se ubica en 25 litros/día (FEDEGAN, 2006).

Colombia se encuentra en el tercer lugar como productora de leche en Suramérica y vigésimo segundo a nivel mundial, sin embargo, la carne y la leche son productos muy importantes dentro del TLC con los Estados Unidos, por lo tanto es necesario aumentar la producción para poder competir, teniendo en cuenta además que las posibilidades se limitan por la colocación en el mercado de derivados como la leche en polvo en la cual Colombia es un modesto productor, comparado con países como Australia o Nueva Zelanda los cuales producen aproximadamente 30 y 70 veces más, respectivamente. En

los departamentos del Cesar, Guajira y Magdalena, donde se realiza la investigación la situación es aún más dramática si tenemos en cuenta que la producción se encuentra por debajo del promedio nacional con una producción promedio de 2.91 litros/vaca/día (FEDEGAN, 2006).

La profundización de las formas de producción y consumo propios del capitalismo contemporáneo, ha llevado a aumentar la preocupación de toda la humanidad respecto a la degradación del medio ambiente y al deterioro de los recursos naturales. En especial, tales preocupaciones tienen que ver con la pérdida de la biodiversidad, la escasez de agua, la destrucción de la capa de ozono y el cambio climático (Presidencia de la República y MADR, 2002). Se ha considerado que el 90% de los suelos utilizados en la actividad agropecuaria de la región Caribe han sufrido diversos niveles de deterioro físico, químico y biológico, afectando severamente su capacidad productiva y comprometiendo a mediano y largo plazo la viabilidad económica de los sistemas ganaderos. Esto debido a factores como la fertilización de síntesis química, la disminución en la biodiversidad ocasionada por la intervención de tipo industrial y el daño, en general, a la integridad de los ecosistemas suelo, agua y aire (Bonilla y Murillo, 1992).

Con el ánimo tanto de aumentar la productividad de la ganadería y así mismo contribuir a la preservación del ambiente, la utilización de otros sistemas productivos se está haciendo más relevante. Tal es el caso de los sistemas productivos tipo silvopastoril. Un sistema silvopastoril se define como un sistema de producción pecuaria en donde las plantas leñosas perennes interactúan con los componentes tradicionales bajo un sistema de manejo integral, lo cual puede ser visto como una alternativa sostenible que permite reducir el impacto ambiental de los sistemas tradicionales de producción (Mahecha, 2002).

El nitrógeno es considerado como el factor más limitante en el desarrollo de las plantas por ser componente fundamental en la estructura de proteínas, ácidos nucleicos, vitaminas, enzimas, clorofila, ATP, algunos lípidos y otros componentes celulares. Debido a la importancia de este elemento, su baja disponibilidad en el suelo, y a los altos costos ecológicos y económicos de la fertilización de síntesis química, la fijación biológica de nitrógeno se ve como una alternativa limpia y eficiente para solucionar el

problema de la disponibilidad de nitrógeno en suelo, y en consecuencia aumentar la productividad del sistema ganadero (Sylvia *et al.*, 2005).

Teniendo en cuenta lo anterior, el aumento en la productividad del sector ganadero es un proceso que no sólo implica el trabajo directo con los animales sino también el mejoramiento de las características del suelo, el tipo y la calidad del forraje, la disponibilidad de nitrógeno y otros nutrientes, la cantidad de luz incidente, la temperatura bajo sombra, entre otros. Y en función de ello, es necesaria la implementación de sistemas de producción donde se proporcione a los animales mejores condiciones para su desarrollo, tarea que es cumplida a cabalidad por los sistemas productivos tipo silvopastoril (Mahecha, 2002; Buergler *et al.*, 2005). Allí las leguminosas juegan un papel fundamental (Ibrahim *et al.*, 2001; Juma *et al.*, 2006). Ésta importancia se debe a su alto contenido en nitrógeno, porcentaje que suele oscilar alrededor de 20%. Ésta característica es adquirida por su capacidad para establecer una relación tipo simbiótica con rizobios; de aquí, que la fertilización con este tipo de microorganismos, se presente como una forma altamente efectiva para el mejoramiento en la productividad del sistema. No obstante, la producción de estos biofertilizantes no es económica debido a los elevados costos del soporte (turba) y del medio de fermentación, principalmente.

En Corpoica, a pesar de que se lleva trabajando 20 años en rizobios, hoy día la producción se lleva a cabo en el medio estándar para estos: -LM- (levadura – manitol) el cual es costoso, razón por la cual el objeto de este trabajo fue la obtención de un medio de cultivo líquido alternativo complejo que permita disminuir los costos de producción y además, basar la estandarización de éste en la utilización de algunos productos y subproductos agroindustriales, con lo cual se puede contribuir de igual manera a la reducción del impacto ambiental generado en los ecosistemas aire, agua y suelo por el vertimiento de algunos de estos residuos.

Objetivos

Objetivo general

Estandarizar un medio de cultivo líquido a escala de laboratorio para la multiplicación de la cepa C50 de *Rhizobium sp.* haciendo uso de productos y subproductos agrícolas e industriales.

Objetivos específicos

1. Estandarizar un protocolo para la producción del inóculo inicial con base en la cepa C50 de *Rhizobium sp.* en medio de cultivo líquido y además elaborar el banco primario y banco de trabajo.
2. Establecer los sustratos con mayor incidencia sobre el desarrollo de la cepa C50 de *Rhizobium sp.*
3. Determinar estadísticamente la relación de sustratos que maximizan la producción del inóculo teniendo en cuenta parámetros técnico-económicos.

Marco Teórico

1. Sistema silvopastoril

Un sistema silvopastoril se define como un sistema de producción pecuaria en donde las plantas leñosas perennes -árboles o arbustos- interactúan con los componentes tradicionales -forrajeras herbáceas y animales- bajo un sistema de manejo integral, lo cual puede ser visto como una alternativa sostenible que permite reducir el impacto ambiental de los sistemas tradicionales de producción (Mahecha, 2002).

El silvopastoreo es un sistema de producción que carga consigo una lista extensa de beneficios no sólo para el medio ambiente, sino para los productores debido a que su implementación trae a futuro, un aumento en la productividad agropecuaria de la zona. Entre los beneficios que conlleva la adopción de este sistema, están el aumento en la fertilidad del suelo, el mejoramiento de sus características físico-químicas, el aumento en el ciclaje de nutrientes, la recuperación de la biodiversidad, la fijación biológica de nitrógeno, el aumento del área de absorción de las raíces, la acción de la micro y macro-fauna en el equilibrio biológico y el control de la erosión (Mahecha, 2002).

Hasta el momento, los sistemas silvopastoriles más estudiados y en el que existen mayor número de reportes han sido los asociados con árboles ó arbustos leguminosos, en donde se da un mayor numero de interacción entre los componentes. Entre las especies arbustivas investigadas en Colombia, consideradas como potenciales por su alto valor nutritivo o servicios multipropósito dentro de los sistemas silvopastoriles se encuentran: la acacia (*Acacia* sp.), el nacedero (*Trichantera gigantea*), el poró (*Erythrina poeppigiana*), la leucaena (*Leucaena leucocephala*), el algarrobo (*Prosopis juliflora*), el chachafruto (*Eythrina edulis*), el pízamo (*Erythrina fusca*), el guacimo (*Guazuma ulmifolia*), el matarratón (*Gliricidia sepium*), el orejero (*Enterolobium cyclocarpum*), el flor amarillo (*Cassia spectabilis*), y el botón de oro (*Tithonia diversifolia*), entre otros (Mahecha, 2002).

2. Fijación biológica de nitrógeno

A pesar que el nitrógeno molecular (N_2) se encuentra en la atmósfera en una concentración de casi el 80%, ni plantas ni animales tienen una forma fácil para obtener el nitrógeno suficiente para su crecimiento. Esta situación se hace aun más crítica ya que el N_2 es una molécula muy estable químicamente y de esta forma no está disponible para la mayoría de los organismos vivos. Este debe ser fijado antes que pueda ser asimilado. Las formas más comunes de encontrar el nitrógeno fijado es en forma de iones amonio y nitrato. La fijación de nitrógeno es el proceso mediante el cual se lleva a cabo la reducción de nitrógeno molecular a amonio (Newton y Fisher, 2002).

En la naturaleza existen dos formas de fijar nitrógeno. Un mecanismo es mediante energía lumínica en la cual la enorme cantidad de luz ioniza las moléculas en la atmósfera y las hace aptas para combinarse y formar óxidos de nitrógeno. Estos óxidos de nitrógeno se disuelven en la lluvia y forman nitritos (NO_2^-) y nitratos (NO_3^-), los cuales son llevados a la tierra. Sin embargo, a pesar de la gran cantidad de energía lumínica alrededor del mundo, esta no es una forma efectiva de producir compuestos nitrogenados que puedan ser utilizados por plantas y animales. Esta forma de fijación de nitrógeno atmosférico probablemente contribuye con el 10% del total anual fijado. La fuente más importante de nitrógeno fijado deriva de la actividad de ciertas bacterias del suelo que absorben el nitrógeno atmosférico y lo convierten en amonio. Algunas de estas bacterias son libres en suelo y se alimentan de materia orgánica muerta. Otras bacterias fijadoras de nitrógeno, son encontradas creciendo en asociación con las raíces de plantas mayores. Las plantas suplen a la bacteria con la energía para crecer, mientras que la bacteria suple a la planta con nitrógeno fijado. Debido a que tanto la planta como la bacteria, se benefician a partir de esta relación, esta interacción se denomina simbiosis. Los procesos biológicos contribuyen con alrededor del 65% de la producción total anual de nitrógeno fijado (Newton y Fisher, 2002).

La síntesis comercial de amonio es otra forma diferente de fijar nitrógeno y contribuye aproximadamente con el 25% del total de nitrógeno fijado anualmente. Aquí el N_2 y el hidrógeno (H_2) son combinados a alta presión y temperatura para formar amonio, el método se denomina Haber-Bosch en honor a sus creadores, sin embargo este es un proceso ambiental y energéticamente costoso (Newton y Fisher, 2002).

3. Organismos fijadores de nitrógeno

Sólo los procariotas pueden llevar a cabo la fijación biológica de nitrógeno – FBN. La habilidad para fijar N_2 es ampliamente usada entre varios géneros de bacteria, luego existen una altísima variedad metabólica entre los microorganismos que tienen esta capacidad. Se distinguen tres formas mediante las cuales los microorganismos pueden llevar a cabo la FBN: por medio de asociaciones simbióticas, simbiosis asociativas, y bacterias de vida libre (Newton y Fisher, 2002).

3.1 Asociaciones simbióticas

Para la agricultura, la relación simbiótica más importante envuelve a las bacterias denominadas rizobios con plantas leguminosas. Esta asociación, maximiza la transferencia de nitrógeno fijado a la planta a partir de los rizobios residentes en su interior, los cuales están presentes en una estructura denominada “nódulo”, en las raíces de la planta. La planta de forma recíproca provee protección y suple de compuestos ricos energéticamente a la bacteria. Los nódulos también proveen un ambiente con bajo contenido de oxígeno, lo cual es vital ya que la nitrogenasa, enzima que cataliza la FBN, es denaturada por el oxígeno (O_2). Sin embargo, algunas cantidades de oxígeno deben ser provistas a la bacteria para que esta pueda respirar y producir la energía requerida tanto para su supervivencia como para conducir la FBN. Una proteína especial transportadora de oxígeno denominada leghemoglobina, regula la cantidad de oxígeno que llega a la bacteria. Esta proteína es de altísima afinidad, puesto que por cada 10000 leghemoglobinas ligadas a oxígeno sólo se encuentra una molécula de oxígeno libre (Madigan *et al.*, 2002; Newton y Fisher, 2002).

Otras relaciones simbióticas fijadoras de nitrógeno incluyen a los líquenes, briofitas, pteridofitas, cicadinas, y otras angiospermas no leguminosas. Los nódulos en raíces de plantas no leguminosas (llamados actinoriza) están presentes en cientos de especies de pequeñas, maderados, árboles dicotiledóneos y arbustos, como *Myrica* sp. y alisos, y también en árboles de gran tamaño tales como *Casuarina* sp., distribuidos tanto en clima tropical como en clima templado. Las bacterias encontradas en estos nódulos son miembros de la familia bacteriana *Streptomyces*, y son clasificados bajo el nombre

genérico *Frankia*. Estas asociaciones entre no leguminosas y *Frankia* son llamadas asociaciones actinorrizicas (Newton y Fisher, 2002).

3.2 Simbiosis asociativas

Desafortunadamente, la relación simbiótica basada en nódulos no se extiende a la mayoría de cultivos alimenticios importantes tales como maíz, arroz, trigo, y cultivos de raíces y tubérculos, ninguno de los cuales tiene una pareja para fijar nitrógeno. Para estos cultivos alcanzar índices de productividad comercialmente aceptables hacen que la fertilización nitrogenada sea requerida. Sin embargo, otras asociaciones menos formales, llamadas asociaciones asociativas son comunes entre ciertas gramíneas y bacterias. Las gramíneas tropicales, *Paspalum* y *Digitaria*, se asocian con las bacterias *Azotobacter paspali* y *Azospirillum brasilense*, respectivamente. Con *Paspalum* la bacteria fijadora de nitrógeno vive afuera del tejido de la planta en una vaina mucilaginoso alrededor de la raíz. La asociación *Digitaria-Azospirillum* envuelve la invasión de la raíz pero no la formación de nódulos. Una asociación formal es la que ejercen *Gluconacetobacter diazotrophicus* y *Herbaspirillum* sp. con la caña de azúcar, quienes satisfacen completamente los requerimientos de nitrógeno fijado para el crecimiento de las plantas. De forma similar, la asociación de *Azoarcus* spp. con la gramínea Kallar y posiblemente con arroz también indican una significancia agronómica y un potencial económico (Newton y Fisher, 2002).

3.3 Bacterias de vida libre

La mayoría de bacterias que fijan nitrógeno no están asociadas con plantas o animales. Ellas viven libres en el suelo y fijan nitrógeno para su propio beneficio y en el momento de su muerte este nitrógeno es aprovechado por las plantas. De estas bacterias de vida libre, las cianobacterias son las más importantes agrícolaemente hablando. Las bacterias más ampliamente estudiadas de vida libre 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). La FBN que hacen estos organismos llega a ser generalmente disponible para el ecosistema circundante cuando la bacteria muere (Newton y Fisher, 2002).

4. La nitrogenasa

La actividad de la nitrogenasa es central para el mantenimiento del ciclo del nitrógeno en la tierra. En un planeta embebido con N_2 , el nitrógeno fijado frecuentemente es el elemento limitante para el crecimiento de los microorganismos, plantas y animales. Un número limitado de procariotas han sido descritos por su habilidad para fijar nitrógeno y las otras criaturas de la tierra explotan la habilidad de estos microorganismos. Los fijadores de nitrógeno están en dependencia de su fotosíntesis o de la fotosíntesis de las plantas verdes para obtener la gran cantidad de energía que es requerida para reducir el nitrógeno molecular. Como es usual, los animales se limitan a ser consumidores y dejan a las plantas verdes y a los microorganismos el trabajo de soportar la vida de los animales vivientes (Burris, 1991).

4.1 Nomenclatura

La nitrogenasa es un sistema enzimático fascinante, y está constituida por dos proteínas diferentes. La dinitrogenasa (también referida como proteína MoFe o proteína I) es una proteína que tiene por función unir y reducir el nitrógeno (N_2) u otros sustratos; y la dinitrogenasa reductasa (también referida como proteína Fe o proteína II) y tiene el rol específico de pasar electrones, uno a la vez, a la dinitrogenasa. Fuertes reductores no reducirán la dinitrogenasa directamente, la mayor parte de la función se hace vía dinitrogenasa reductasa (Burris, 1991).

4.2 El complejo enzimático

El complejo Nitrogenasa está compuesto por dos proteínas que pueden ser purificadas separadamente: dinitrogenasa y dinitrogenasa reductasa. La dinitrogenasa también referida como la proteína MoFe o componente I, es un tetrámero de 220-240 KDa producto de los genes *nifD* y *nifK* que contienen dos pares de dos complejos metaloclusters conocidos como el P-Cluster y el cofactor hierro – molibdeno (Fe-Mo-co). Cada par $\alpha\beta$ de subunidades de NifD y NifK contiene un P-cluster y una molécula de FeMo-co. La dinitrogenasa reductasa, también referida como la proteína de Fe o componente II, es un dímero de 60 KDa producto del gen *nifH*, esta contiene un simple cluster [4Fe-4S] en la interfaz de la subunidad y dos sitios de unión de MgATP, una a cada subunidad. La proteína de hierro es el donador obligado de electrones a la proteínas MoFe (Rubio y Ludden, 2005).

4.3 Modo de acción de la nitrogenasa

La transferencia de electrones desde la dinitrogenasa reductasa a la dinitrogenasa requiere la mediación de MgATP. La dinitrogenasa reductasa es reducida por la ferredoxina o la flavodoxina. Esta une MgATP con lo que su potencial disminuye de 100 mV a alrededor de -400 mV. A este potencial pueden transferirse electrones a la dinitrogenasa. La transferencia está acompañada por la hidrólisis de MgATP a MgADP y Pi. Como el ADP es inhibitorio de la reacción, éste debe ser convertido nuevamente a ATP. Un electrón es transferido por cada 2MgATP hidrolizados. Como un simple electrón es inadecuado para llevar a cabo la reducción del N₂, el ciclo debe ser repetido hasta que la dinitrogenasa haya acumulado los electrones adecuados para la reducción. Como la reducción de N₂ esta acompañado por una obligatoria reducción de 2H⁺ → H₂ la reacción completa es la siguiente:



Al ser necesarios 2MgATP por cada electrón transferido, la reacción requiere un mínimo de 16MgATP bajo condiciones ideales. Sin embargo, bajo condiciones fisiológicas los requerimientos están cercanos a los 20-30 MgATP. La hidrólisis de ATP acompaña la transferencia de electrones desde la dinitrogenasa reductasa a la dinitrogenasa, y está establecido que el clivaje de MgATP y la conversión a MgADP + Pi ocurre antes de la transferencia del electrón desde la dinitrogenasa reductasa a la dinitrogenasa en preparaciones de *K. pneumoniae* (Burris, 1991).

4.4 Sustratos para la nitrogenasa

El sustrato fisiológico para la nitrogenasa es el N₂. Sin embargo, la nitrogenasa es versátil y puede reducir una variedad de sustratos. La reducción de protón a H₂ es una reacción obligatoria de la nitrogenasa cuando reduce N₂, N₂O, cianuro, metil isocianuro, azida, acetileno, ciclopropano, cianamida y diazirina que también sirven como sustratos. El N₂O fue el otro primer compuesto sobre el cual fue demostrado servir como sustrato alternativo para la nitrogenasa. El sustrato alternativo más utilizado ha sido el acetileno (H-C≡C-H), ya que este suministra una simple y altamente sensible prueba para la efectividad de la nitrogenasa. Este se reduce a C₂H₄ el cual puede ser detectado en muy bajas concentraciones con un cromatógrafo de gases equipado con un detector de flama de ionización (Burris, 1991).

5. Simbiosis leguminosa – rizobio

5.1 Las leguminosas

La habilidad para establecer una simbiosis fijadora de nitrógeno con rizobios es estricta de las leguminosas, con una excepción, el género *Parasponia* de Ulmaceae. La familia Leguminosae comprende tres subfamilias Caesalpinioideae, Mimosoideae, y Papilionoideae, cada una de las cuales contiene géneros aptos para formar nódulos en las raíces. En estas tres subfamilias, el porcentaje de especies noduladas son diferentes. Hay unos pocos géneros no nodulantes en las subfamilias avanzadas Papilionoideae y Mimosoideae, pero la subfamilia menos especializada Caesalpinioideae incluye muchos géneros no nodulantes. Caesalpinioideae es la subfamilia más primitiva de los Fabales, se asume que la simbiosis fue desarrollada en un estado relativamente tardío durante la evolución de las leguminosas. Esta noción está soportada por el hecho que varias especies de *Parasponia* de la familia Ulmaceae forman nódulos que fijan nitrógeno como las leguminosas. Dado que los miembros de Ulmaceae no están más estrechamente relacionados con los miembros de la familia Leguminosae que con casi cualquier otra familia de las dicotiledóneas, un sentido filogenético no real puede ser hecho de este fenómeno. Las plantas leguminosas son muy diversas en morfología, hábitat y ecología, yendo de anuales árticas a árboles tropicales. Debido al gran número de leguminosas que son noduladas por rizobios, la simbiosis con rizobios no es aparentemente una adaptación a un nicho ecológico especializado sino que depende de alguna peculiaridad genética de las leguminosas, una que es tan compleja que raramente ha envuelto a cualquier otra planta del reino (Cook *et al.*, 2005).

5.1.1 *Leucaena leucocephala*

5.1.1.1 Descripción

Es un árbol o arbusto caducifolio o perennifolio, que alcanza de tres a seis metros de altura incluso doce metros con un diámetro a la altura del pecho de hasta 25 cm. La copa es redondeada y ligeramente abierta. Tiene hojas alternas, bipinnadas, de 9 a 25 cm de largo, verde grisáceas y glabras; folíolos de 11 a 24 pares, de 8 a 15mm de largo, elípticos y algo oblicuos. El tronco es usualmente torcido y se bifurca a diferentes alturas, con ramas cilíndricas ascendentes, desarrollando muchas ramas finas cuando crece aislado. La corteza es externa lisa a ligeramente fisurada, gris negruzca, con

abundantes lenticelas longitudinales protuberantes. Interna de color crema-amarillento, fibrosa, amarga, con olor a ajo. Grosor total: 3 a 4 mm. La flor es en forma de cabezuelas, con 100 a 180 flores blancas, de 1.2 a 2.5 cm de diámetro; flor de 4.1 a 5.3 mm de largo; pétalos libres; cáliz de 2.3 a 3.1 mm. El fruto se ve como vainas oblongas, estipitadas, en capítulos florales de 30 o más vainas, de 11 a 25 cm de largo por 1.2 a 2.3 cm de ancho, verdes cuando tiernas y cafés cuando maduras; conteniendo de 15 a 30 semillas. Las semillas son ligeramente elípticas de 0.5 a 1 cm de largo por 3 a 6 mm de ancho, aplanadas, color café brillante, dispuestas transversalmente en la vaina. La semilla está cubierta por una cera que retarda la absorción de agua durante la germinación, la raíz es profunda y extendida; la raíz primaria penetra en las capas profundas del suelo y aprovecha el agua y los minerales por debajo de la zona a la que llegan las raíces de muchas plantas agrícolas. *Leucaena leucocephala* es una planta hermafrodita (Cook *et al.*, 2005).

5.1.1.2 Hábitat

Prospera en ambientes adversos. Se adapta muy bien a las tierras bajas, crece desde sitios secos con precipitaciones anuales de 350 mm/año hasta húmedos con 2,300 mm/año y temperatura media anual de 22 a 30 °C. Es necesario un período seco de 4 a 6 meses para su establecimiento. Crece en una amplia variedad de suelos, desde neutros, hasta alcalinos, siempre y cuando sean suelos bien drenados, no compactados, ni ácidos. Los mejores resultados se obtienen en suelos con pH de 6.5 a 7.5. Suelos inferiores a 5.5 pH no son recomendables (Cook *et al.*, 2005).

5.1.1.3 Crecimiento

Leucaena leucocephala es una especie de rápido crecimiento, longevidad de 50 años. Muestra un incremento medio anual de 2.8 m en altura y 2.4 cm en diámetro. El crecimiento es lento en las primeras etapas de desarrollo de la planta y en sitios donde no hay estación seca bien definida y la precipitación es mayor a 2,500 mm (Cook *et al.*, 2005).

5.2 Los rizobios

Con base en las secuencias de genes de 16S rRNA, todos los rizobios son miembros del phylum Proteobacteria, pero en diferentes clases y ordenes. La mayor parte de los rizobios son del orden VI, Rhizobiales, de la clase I, α -proteobacteria. En este orden, los

géneros *Rhizobium*, *AlloRhizobium* y *SinoRhizobium* se incluyen en la familia Rhizobiaceae. *MesoRhizobium* está en la familia Phylobacteriaceae. *Bradyrhizobium* y *Blastobacter* están en la familia Bradyrhizobiaceae. *AzoRhizobium* y *Devosia* se incluyen en la familia Hyphomicrobiaceae. En el mismo orden, también se encuentran bacterias formadoras de nódulos en *Methylobacterium* de la familia *Methylobacteriaceae*. Sólo dos grupos bacterianos en la clase II, β -proteobacteria, incluyen bacterias que forman nódulos con las leguminosas. Ellas son *Burkholderia* spp. y *Ralstonia taiwanensis* en el orden Burkholderiales (Wang y Romero, 2004).

Aunque estas bacterias tienen muy diversas relaciones filogenéticas al comparar a los genes 16S rRNA, se encuentra una gran similitud entre las secuencias de sus genes simbióticos, como *nif* y *nod*, indicando que transferencias horizontales de los genes simbióticos ocurrieron en la naturaleza entre ellas, como se ha descrito en especies de *MesoRhizobium*. Este evento es importante para la evolución de los rizobios, porque cada género tiene vecinos no simbióticos que tienen el potencial de recibir los genes simbióticos desde los rizobios. Todos estos datos indican que los rizobios y sus vecinos filogenéticos tenían orígenes comunes. Se puede suponer que nuevos linajes de rizobios sigan emergiendo todavía en la naturaleza debido a la transferencia de los genes simbióticos y al hecho de que bacterias no simbióticas, relacionadas con rizobios, pueden convertirse en bacterias formadoras de nódulos eficientes tanto en condiciones de laboratorio como de campo (Wang y Romero, 2004).

5.2.1. *Rhizobium* sp.

5.2.1.1 Descripción microscópica y macroscópica

Bacilos de 0.5-1.0 X 1.2-3.0 μm . No esporoformados. Gram negativo. Móvil por flagelos peritricos, generalmente entre 1 y 6. Las fimbrias han sido descritas en algunas cepas (Kuykendall *et al.*, 2005). Las colonias son usualmente blancas o beige, circulares convexas, semitraslúcidas u opacas, a veces mucoides, usualmente de 2-4 mm de diámetro dentro de 3-5 días de incubación en -LMA- (Levadura - Manitol - Sales - Agar). El crecimiento en un medio de carbohidratos es usualmente acompañado por abundante cantidad de exopolisacáridos extracelulares. Pronunciada turbidez se desarrolla de 2 a 3 días en caldo aireado o agitado (Kuykendall *et al.*, 2005).

5.2.1.2 Metabolismo

Aeróbicos, poseen un metabolismo tipo respiratorio con oxígeno como aceptor de terminal electrones. Su temperatura óptima de crecimiento está entre 25 y 30°C; algunas especies pueden crecer a temperaturas de 40°C. El pH óptimo de crecimiento está entre 6.0 y 7.0, sin embargo pueden crecer entre valores de 4.0 a 10.0. El tiempo de generación de las cepas de *Rhizobium* está entre 1.5-5.0 horas. (Kuykendall *et al.*, 2005).

Es quimiorganoheterótrofo, utiliza un amplio rango de carbohidratos y sales de ácidos orgánicos como única fuente de carbono, sin formación de gas. No son capaces de metabolizar la celulosa y el almidón. Producen una reacción ácida en medio mineral que contenga sales y manitol u otros carbohidratos. Las sales de amonio, de nitrato y la mayoría de los aminoácidos pueden servir como fuente de nitrógeno. Algunas cepas requieren factores de crecimiento como biotina, pantotenato o ácido nicotínico. La peptona es pobremente utilizada mientras que la caseína, el almidón, la quitina y el agar no son hidrolizadas (Kuykendall *et al.*, 2005).

Los principales mecanismos para el catabolismo de la glucosa son la vía de Entner-Doudoroff y el ciclo de las pentosas fosfato. Es poco probable que la vía de Embden-Meyerhof-Parnas opere en *Rhizobium* sp., debido a que la actividad de las enzimas fructosa-1,6 difosfato aldolasa y 6-fosfofructoquinasa son bajas. Los polioles son sustratos para una deshidrogenasa inducible que convierte manitol en fructosa o xilulosa. La L-arabinosa es metabolizada a α -cetoglutarato. El ciclo de los ácidos tricarbónicos es operativo, y las enzimas del bypass glioxalato están presentes. La piruvato carboxilasa es una importante enzima anaplerótica. El ácido glucurónico y glucárico son metabolizados vía el ácido 2-ceto-3-deoxi-d-glucárico a α -cetoglutarato (Kuykendall *et al.*, 2005).

Tabla 1 Metabolismo de algunas fuentes de crecimiento por algunas especies de *Rhizobium*.

Sustrato	<i>R. legumi- nosarum</i>	<i>R. galagae</i>	<i>R. tropici</i>	Sustrato	<i>R. legumi- nosarum</i>	<i>R. galagae</i>	<i>R. tropici</i>
Número de cepas	37	2	3	2-Cetogluconato		+	-
Acetato		+	d	5-Cetogluconato		-	-
N-acetilglucosamina		+	+	2-Cetoglutarato		d	+
Aconitato		-	+	DL-Lactato	-	+	+
Adonitol		+	+	L-Leucina	+	d	d
L- α -alanina	+	+	+	L-Lisina	+	d	-

β -alanina	-	-		L-Lyxosa	+	+
DL-3-aminobutirato	-	-		Malonato	-	d
DL-4-aminobutirato	-	d		D-Mandelato	-	+
DL-5-aminovalerato	d	-		L-Mandelato	-	+
Amigdalina	-	+		D-Melibiosa	+	+
D-arabinosa	+	+		D-Melezitosa	-	-
L-arabitol	-	+		Metil-D-glicosidasa	d	+
Arbutina	+	+		Metil-D-xiloside	-	+
L-arginina	+	d	-	L-ornitina	d	d
L-aspartato	-	+		L-Fenilalanina	+	+
Butirato	-	-		Propionato	-	-
Citrato	-	d	d	Piruvato	-	+
L-Citrulina	-	d		D-Rafinosa	+	+
L-Cisteina	+	-	-	Salicina	-	d
Dulcitol	+	-	-	Sarcosina	-	d
Eritrol	+	-	d	L-Serina	+	+
Etanolamina	d	-		L-Sorbosa	-	-
D-Fucosa	+	d		D-Tagato	-	-
Gluconato	+	+	+	D-Tartrato	-	-
L-Glutamato	+	-	+	L-Tartrato	-	+
Glutarato	-	d		<i>meso</i> -Tartrato	-	-
DL-Glicerato	d	+		L-Treonina	+	d
Glicolato	-	-		Trigonelina	-	+
m-Hidroxibenzoato	+	-		L-Tirosina	+	+
p-Hidroxibenzoato	+	+		L-Valina	+	-
DL-3-Hidroxibutirato	+	d		Xilitol	+	+
Isobutirato	-	-		L-Xilosa	-	+

Convenciones. (+): Reacción poitiva, (-): reacción negativa, (d): reacción positiva en algunas cepas, (): Información disponible para menos de dos cepas. Tomado de Kuykendall *et al.*, (2005).

5.2.1.3 Genética

El primer mapa del cromosoma de *R. leguminosarum* fue construido por Beringer y Hopwood en 1976. El genoma de *SinoRhizobium meliloti* también ha sido mapeado. Estas dos especies tienen un arreglo similar en el arreglo de su cromosoma. *S. meliloti* tiene un cromosoma de 3.7×10^6 pb y su secuencia ya ha sido reportada. Regiones fácilmente amplificadas en genomas de *Rizobium* sp. llamadas amplicones, aparentemente controlan tanto la adaptabilidad como las interacciones biológicas.

Como estas llegan a ser mejor definidas a través del mapeo y secuenciación del DNA, su estructura puede ser de particular interés (Kuykendall *et al.*, 2005).

Con respecto al DNA extracromosomal, los rizobios pueden tener tanto plásmidos como megaplásmidos que pueden llegar a los 1600 kb y pueden constituir hasta el 50% del genoma total. Algunos miembros de Rhizobiaceae y Phyllobacteriaceae se caracterizan por su habilidad para incorporar elementos génicos funcionales como plásmidos o islas simbióticas las cuales permiten establecer una relación de tipo patógena, o simbiótica para fijar nitrógeno con las plantas. La simbiosis fijadora de nitrógeno que envuelve a miembros de Rhizobiaceae generalmente está restringida a plantas de la familia *Leguminosae*. Las células de *Rhizobium* sp. contienen hasta 10 plásmidos que van en tamaño desde 100 kb hasta mas de 1000 kb. En algunas ocasiones, la longitud aproximada de la combinación de plásmidos y megaplásmidos puede significar más del 50% del genoma de *Rhizobium*. Tanto los genes *nod* como los *nif*, implicados en simbiosis y fijación de nitrógeno respectivamente, han sido siempre hallados juntos en uno o más plásmidos de *Rhizobium* llamados pSym. Numerosos estudios genéticos han delineado los genes esenciales para la nodulación de leguminosas y la fijación de nitrógeno simbiótica. Los genes que controlan la nodulación estan organizados en varios operones regulados coordinadamente. Por ejemplo, el operon *nodABC* esta presente en todas las cepas simbióticas con leguminosas y puede complementar cepas en diferentes géneros. Para *R. etli*, *nodA* esta separado de *nodBC* y para *MesoRhizobium loti*, *nodB* es independiente de *nodAC*. Otros podrían presentar en diferentes especies como variantes alélicas, tales como *nodEF*, y estos son específicos de hospedero y por ello no son intercambiables. Los plásmidos pSym no son esenciales para la supervivencia de las cepas de *Rhizobium* en suelo. Las bacterias del suelo no nodulantes identificadas como especies de *Rhizobium* han sido aisladas y pueden llegar a formar nódulos después de una transconjugación con especies simbióticas relacionadas. La transferencia de plásmidos simbióticos entre especies de *Rhizobium* ha sido reportada bajo condiciones de laboratorio y ha sido demostrado por comparación de secuencias de aislamientos naturales (Kuykendall *et al.*, 2005).

5.3 La simbiosis

Con el objeto de iniciar una simbiosis productiva, los rizobios deben reconocer y entonces responder a la presencia de la raíz de la planta hospedera. Durante el crecimiento en la rizósfera de una planta hospedera, los rizobios detectan compuestos tales como flavonoides y betaínas que son secretados por la raíz hospedera para la inducción de los genes *nod*. Los genes *nod* codifican para aproximadamente 25 proteínas requeridas para la síntesis bacteriana y la exportación de los factores Nod. Los factores Nod son señales de lipooligosacáridos que consisten de una columna de quitina que tiene de cuatro a cinco unidades de N-acetilglucosamina de largo, con un lípido atado al extremo no reductor y modificaciones específicas al hospedero en la columna vertebral. Los factores Nod hincan muchos de los cambios de desarrollo vistos en la planta hospedera en las fases tempranas del proceso de nodulación, incluyendo deformación de los pelos radiculares, polarización de la membrana, oscilaciones intracelulares de calcio, y la iniciación de la división celular en el corte radicular, con lo cual se establece un meristemo y un primordio nodular (Gage, 2004).

Otras respuestas de los rizobios cuando encuentran una raíz hospedera indudablemente involucran los cambios en la expresión de otros genes los cuales están envueltos en la síntesis de los factores Nod. Tales genes parecen ser importantes para los rizobios ya que les permiten competir efectivamente con otros organismos para el acceso a los sustratos de crecimiento que son emanados de la raíz hospedera, para adherirse a la superficie radicular, y para conferir resistencia a sustancias tóxicas tales como fitoalexinas secretadas por la raíz (Gage, 2004).

Durante las fases tempranas de la simbiosis, los rizobios deben dirigirse de la superficie de la raíz al interior del tejido radicular donde ellos poblaran de células el nódulo incipiente. Para esto, ellos crecen y dividen dentro de un túbulo denominado tubo de infección. La formación del tubo de infección la mayor parte de las veces es iniciado cuando los rizobios son atrapados entre dos paredes celulares de los pelos radiculares. Esto usualmente ocurre cuando un pelo radicular deformado forma un “rizo”, y la bacteria se une al pelo radicular y es atrapada entre las paredes celulares. La invaginación de la pared celular en el rizo, o la degradación de la pared y la invaginación de la membrana celular, es seguida por el crecimiento de la punta resultado de la invaginación en la iniciación del tubo de infección que crece hacia abajo, dentro del pelo radicular y dentro del cuerpo de las células epidérmicas. Los

rizobios dentro del tubo de infección crecen y se dividen, de aquí el tubo logra llenarse con bacterias. Si el tubo de infección sale de las células epidermales, hay entonces una fusión con las paredes celulares de las células distales y así la bacteria entra en el espacio intercelular entre la célula epidérmica y la capa intercelular. La ramificación del tubo como su crecimiento a través de la raíz y la entrada al primordio del nódulo incrementa el número de sitios a partir de los cuales la bacteria puede sacar el tubo y entrar a las células de los nódulos, asegurando el número suficiente de células del nódulo colonizadas. La bacteria dentro del tubo de infección eventualmente sale y entra a las células del nódulo. Frecuentemente dentro de las células nodulares, las bacterias continúan la diferenciación y la síntesis de proteínas requeridas para la fijación de nitrógeno y para el mantenimiento de las relaciones mutualistas (Gage, 2004).

5.4 Algunos reportes

El nitrógeno atmosférico fijado simbióticamente por la asociación entre especies de rizobios y leguminosas representa una fuente renovable de nitrógeno para la agricultura. Valores estimados para varios cultivos de leguminosas y especies de pasturas son con frecuencia impresionantes, comúnmente caen en el rango de 200 a 300 kg de N/ha/año. La producción de los cultivos incrementa frecuentemente después de la cosecha con leguminosas y se hace equivalente a la fertilización esperada por la aplicación de 30 a 80 kg de fertilizante nitrogenado por hectárea. Las entradas de nitrógeno fijado por alfalfa, trébol rojo, arveja, soya, caupí y guisantes fueron estimados por estar entre 65 y 335 kg de N/ha/año o 23 a 300 kg de N/ha/año. Las entradas en los ecosistemas terrestres de FBN a partir de la relación simbiótica entre leguminosas y sus rizobios es de 70.000.000 toneladas de N/ha/año (Brockwell *et al.*, 1995). Esta enorme cantidad tenderá a ser aumentada a medida que la población mundial se incremente y las fuentes naturales que suplen los fertilizantes nitrogenados disminuyan. Este objetivo será logrado a través del desarrollo de variedades de leguminosas superiores, mejorando las prácticas agrícolas, e incrementando la eficiencia del proceso de FBN en sí mismo por el mejoramiento en el manejo de las relaciones simbióticas entre plantas y bacterias (Sahran, 1999).

La simbiosis entre rizobios y leguminosas es una manera económica y efectiva para asegurar un adecuado suplemento de N en los cultivos basados en leguminosas y para

la producción de pasturas más aún que la aplicación de fertilizantes de síntesis basados en nitrógeno. La introducción de algunas leguminosas en pasturas se ha visto como la mejor estrategia para mejorar la nutrición de nitrógeno en gramíneas. Grandes contribuciones (entre 75 y 97 kg de N/ha en 97 días de cultivo) para *Stylosanthes guianensis* fueron halladas. Datos de ^{15}N revelaron que alrededor del 30% del nitrógeno acumulado por las gramíneas en césped mezclado pudo ser derivado a partir del nitrógeno fijado por la asociación con leguminosas (Viera *et al.*, 1995). Otros estudios han revelado que la contribución de nitrógeno de *Arachis hypogaea* al crecimiento de *Zea mays* en sistemas de intercultivo es equivalente a la aplicación de 96 kg de fertilizante nitrogenado por hectárea con un radio de densidad de población de plantas, de una planta de maíz por cuatro de cacahuete (Sahran, 1999)

6. Inoculantes rizobianos

Los inoculantes rizobianos son formulaciones comerciales que contienen rizobios, para ser aplicados a la semilla o al suelo durante la plantación. Está estimado que aproximadamente 2.000 toneladas de inoculantes son producidas anualmente en el mundo, una cantidad suficiente para inocular 20 millones de hectáreas de leguminosas. La gran mayoría, casi el 50%, son producidos en los Estados Unidos de América. Los inoculantes son usualmente comercializados en presentación sólida, en polvo como turba o en formas granuladas, o como inoculantes líquidos, en formulaciones de caldo. Las formulaciones alternas tales como productos concentrados basados en aceites, cultivos liofilizados o células de rizobios atrapados en perlas han sido investigados. Los métodos de inoculación dependen del tipo de inoculante, los polvos y los líquidos son generalmente aplicados sobre las semillas, mientras que los inoculantes granulares son aplicados directamente al suelo (Rebah *et al.*, 2007).

Los inoculantes sólidos son preparados por la adición del medio de cultivo previa multiplicación de los microorganismos, así conteniendo una gran población de rizobios, a un soporte en polvo seguido por un periodo de maduración para asegurar la multiplicación o adaptación de las células. De este modo, la producción de una gran cantidad de rizobios en un medio líquido constituye el primer paso en la producción de inoculantes en polvo para leguminosas. La economía de este proceso está gobernada

por el costo y la disponibilidad de una fuente de carbono apropiada. El medio estándar que incluye manitol como fuente carbono y extracto de levadura como fuente de nitrógeno, factores de crecimiento y sales minerales, ha sido empleado para la producción a escala de laboratorio, pero este uso es limitado a escala industrial debido a su alto costo debido a que es un medio de cultivo en el que se emplean reactivos químicos de tipo analítico. Entre los soportes que pueden sostener altos niveles de rizobios, la turba es la más empleada pero no está universalmente disponible. De forma alterna, diferentes materiales tales como sub-productos industriales, arcillas, perlita y residuos agroindustriales han sido evaluados como medios de cultivo para el crecimiento de los rizobios. La mayoría de los materiales deben ser recursos locales de alta disponibilidad y costo mínimo, con el fin de garantizar la disminución de costos durante los procesos de producción de inoculantes, con el fin que las tecnologías generadas lleguen a un bajo valor económico al agricultor (*Comunicación personal*, Garrido, 2008; Rebah *et al.*, 2007)

6.1 Calidad en inoculantes rizobianos

Los inoculantes comerciales han sido usados por más de un siglo, y ellos han contribuido al incremento de la productividad de los cultivos. Un buen inoculante debe ser preparado con una cepa de rizobio seleccionada por la alta eficiencia en la FBN y la habilidad competitiva para la nodulación. Las cepas deben sobrevivir en la formulación del inoculante, manteniendo sus propiedades durante el almacenamiento, y tolerando factores de estrés tales como la acidez, la desecación, las altas temperaturas y los plaguicidas agroquímicos empleados en los cultivos. El factor más importante en la calidad de un inoculante es un alto número de rizobios vivos ($> 2 \times 10^9$ ufc/g) y ninguna o una mínima contaminación por microorganismos no antagonistas de los rizobios o patógenos para plantas y humanos (Rebah *et al.*, 2007).

6.2 Ventajas de la fertilización con rizobios

La simbiosis leguminosa-rizobio juega un rol importante en agricultura, debido a que ofrece la habilidad de convertir nitrógeno molecular atmosférico en formas disponibles para la planta, proceso conocido como fijación biológica de nitrógeno, además en algunos tipos de cultivo puede asegurar hasta el 100% de la fertilización nitrogenada. La mayoría de las investigaciones para optimizar la fijación simbiótica de nitrógeno y

para incrementar el uso de leguminosas en sistemas de cultivos ha sido en parte estimulado por el incremento en el precio de los fertilizantes y por los aspectos ambientales implicados detrás de la aplicación de este tipo de fertilizantes, por lo tanto también contribuye a la preservación del medio ambiente que ha sido afectado por la utilización de fertilizantes químicos de síntesis. Además, este tipo de bioinoculantes conllevan un beneficio adicional que es la producción de factores de crecimiento vegetal, la solubilización de fósforo, actividad ACC deaminasa, entre otras (Rebah *et al.*, 2007).

7. Banco de cepas

Actualmente, la mayor parte de los laboratorios de microbiología cuentan con una colección de microorganismos, generando la necesidad de implementar métodos de conservación que permitan mantener la viabilidad celular por un periodo prolongado de tiempo. En general, las colecciones de cepas tienen dos fines esenciales: preservación de especies de alto valor y distribución de las mismas. Se distinguen varios métodos de preservación, y uno de los parámetros de distinción entre ellos es el tiempo de conservación; de esta manera se pueden encontrar métodos a corto, mediano y largo plazo. Lo que busca la conservación es mantener la célula viable y estable tanto genética como bioquímicamente, los métodos a largo plazo son los que cumplen con este fin por un periodo más amplio de tiempo. Dentro de esta categoría se distinguen dos métodos fundamentalmente: liofilización y criopreservación, sin embargo, no todas las células son aptas para el uno o el otro método, así la escogencia de éste se hace relevante a la hora de realizar la conservación. Algunos de los factores que se tienen en cuenta para la preservación de cepas son los siguientes: géneros a ser preservados, mantenimiento de la pureza, mantenimiento de la viabilidad y estabilidad genética, propiedades especiales del cultivo, número de cultivos preservados, frecuencia del uso de los cultivos, equipos y espacio de almacenamiento, necesidades de las áreas de investigación y costos (Plazas, 2007).

7.1 Criopreservación

Es el congelamiento y almacenamiento de células a muy bajas temperaturas en donde el agua, que es uno de los mayores componentes de la célula viva, es reemplazado por

hielo durante el proceso. Esto provoca el frenado de la actividad metabólica de la célula (Monroy y Mesa, 2002).

Congelar las células ayuda a mantener la estabilidad del material vivo durante largos periodos de tiempo. Cuando una suspensión se congela el agua es convertida en hielo, este proceso es iniciado a 0°C pero la temperatura real del congelamiento depende de las características de la misma, dicha temperatura puede disminuir por la adición de sustancias como crioprotectantes. Los cambios a consecuencia del proceso pueden dañar a la célula abruptamente, siendo estos cambios físicos o biológicos, debido a los procesos de congelamiento y descongelamiento. Durante el proceso de congelamiento es importante tener en cuenta: el tipo de unidades de cristalización desarrolladas, la cantidad de hielo formado, y la configuración y distribución relativa de las fases amorfas y cristalinas (Monroy y Mesa, 2002).

7.1.1 Tipo de unidades de cristalización desarrolladas

La combinación de las bajas temperaturas, la tasa de congelamiento, la naturaleza y concentración de los solutos establecen el tipo de formación de hielo a formar. Se pueden clasificar en: 1) sólidos compactos sin ángulos; 2) formas de arborescencia como preservación hexagonal, que se da cuando la tasa de congelamiento es baja, y arborescentes irregulares cuando el congelamiento es rápido; 3) esferales cuando el congelamiento es muy rápido (Wolstenholme y O'connor, 1970; Monroy y Mesa, 2002).

7.1.2 Cantidad de hielo formado

En una suspensión celular, la aparición de hielo en las primeras fases del proceso de congelamiento provoca un incremento en la concentración de solutos en el exterior de las células. Debido a la generación de un ambiente hipertónico, el agua sale de la célula generando un desbalance en la concentración de sales, en este proceso intervienen directamente la tasa de congelamiento y la permeabilidad celular. Al aumentar la concentración de solutos dentro de la célula esta podría ser dañada por un desbalance osmótico. En el caso contrario, si la concentración de agua al interior de la célula alta, puede causar daño en la célula por la formación de cristales de hielo en el interior. Este delicado balance involucra la tasa de congelamiento y descongelamiento, entre mas rápido mejores resultados se obtienen (Simione y Brown, 1991).

7.1.3 Velocidad de congelamiento

La velocidad de congelamiento (formación de hielo), influye directamente en la forma y tamaño de los cristales. Cuando la tasa de congelamiento es rápida, es mayor la cantidad de hielo intracelular y menor el desbalance osmótico. Así un congelamiento rápido, minimiza los efectos de la concentración de solutos con una formación uniforme de hielo. Por otra parte, el uso de aditivos crioprotectores resguarda la célula durante estos procesos y de igual manera minimiza los efectos perjudiciales de un incremento en la concentración de solutos y de la formación de hielo (Simione y Brown, 1991).

7.1.4 Consecuencias del congelamiento de las células

Las temperaturas de congelamiento desarrollan algunos cambios en la célula como: la exosmosis –incremento en la solubilidad de gases- lo que resulta en la formación de burbujas, deshidratación –incremento en la concentración de electrolitos, sales, carbohidratos, lípidos, proteínas-, disminución del pH, cambios en la conductividad eléctrica, disminución en la actividad enzimática, disminución de la actividad enzimática, acumulación de intermediarios metabólicos, reducción del espacio intermolecular, incremento del contacto intermolecular, disrupción de puentes de hidrógeno débiles, plegamiento y distorsión de moléculas largas, pérdida de la integridad de la membrana celular, invasión a la célula de sales tóxicas y mutagénicas, solidificación e inmovilización de todas las moléculas y, aumento de la viscosidad (Monroy y Mesa, 2002).

7.1.5 Glicerol como agente crioprotector

Este compuesto tiene la capacidad de poder penetrar la membrana celular sin afectar la osmolaridad del medio. Por consiguiente, pueden estar en concentraciones altas sin alterar el volumen celular. Sin embargo, la adición de glicerol provoca una disminución en la formación de hielo cuando la temperatura se disminuye, luego puede llegar a reducir la ruptura celular por la formación de cristales durante el proceso de crioconservación. Además, este tipo de aditivos protegen a la célula reduciendo la concentración de electrolitos en la solución residual congelada siempre y cuando éste sea permeable (Monroy y Meza, 2002).

8. Medios de cultivo

Los medios de cultivo son las soluciones nutritivas que se usan en el laboratorio para el cultivo de los microorganismos.

8.1 Clasificación de los medios de cultivo según su composición

En microbiología, se usan dos tipos generales de medios de cultivo: los químicamente definidos y los complejos –o no definidos-. Los medios definidos se preparan añadiendo cantidades precisas de compuestos orgánicos e inorgánicos purificados a un volumen de agua destilada. Por tanto, se sabe la composición química exacta de un medio definido. Sin embargo, en muchos casos la composición exacta de un medio no es importante. A menudo los medios complejos emplean hidrolizados de caseína, carne, soya, levaduras u otras sustancias muy nutritivas. Tales hidrolizados están disponibles comercialmente en forma de polvo y pueden ser pesados con facilidad y disueltos en agua destilada para preparar un medio (Madigan *et al.*, 2002).

8.2 Nutrición microbiana

En esencia la nutrición microbiana consiste en suministrar a las células los ingredientes químicos que necesitan para hacer sus monómeros. Estos compuestos químicos son los nutrientes. Diferentes organismos necesitan diferentes tipos de nutrientes y a menudo los requerimientos son específicos. Además, no todos los nutrientes se necesitan en las mismas cantidades; algunos llamados macronutrientes se precisan en grandes cantidades; mientras que otros, llamados micronutrientes se requieren en menores cantidades y a veces sólo en cantidades trazas (Madigan *et al.*, 2002).

8.2.1 Carbono y nitrógeno

Muchos procariotas necesitan algún tipo de compuesto orgánico como fuente de carbono. Los estudios nutricionales han demostrado que las bacterias pueden asimilar varios compuestos orgánicos carbonatados y usarlos para hacer nuevo material celular. Los aminoácidos, los ácidos grasos, los ácidos orgánicos, los azúcares, las bases nitrogenadas, los compuestos aromáticos y un sinnúmero de compuestos orgánicos de otro tipo pueden ser usados por una u otra bacteria. Algunos procariotas son autótrofos, capaces de construir todas sus estructuras orgánicas a partir del dióxido de carbono con la energía obtenida de la luz o de compuestos inorgánicos. En peso seco, una célula

típica contiene un 50% de carbono; el carbono es el principal elemento de todas las clases de macromoléculas (Madigan *et al.*, 2002).

Después del carbono, el siguiente elemento más abundante en la célula es el nitrógeno. En una bacteria típica alrededor del 12% de su peso seco es nitrógeno, este elemento es importante en las proteínas, en los ácidos nucleicos y en otros constituyentes celulares. En la naturaleza, el nitrógeno no se presenta en forma inorgánica y orgánica. Sin embargo, la mayor parte del nitrógeno natural disponible está en forma inorgánica como el amoníaco, nitratos o nitrógeno molecular. La mayoría de las bacterias son capaces de usar amoníaco como única fuente de nitrógeno, y otras muchas pueden usar nitratos. El nitrógeno gaseoso (N₂) puede ser usado como fuente de nitrógeno por algunas bacterias, las bacterias fijadoras de nitrógeno (Madigan *et al.*, 2002).

Tabla 2 Micronutrientes en la naturaleza y en los medios de cultivo

Elemento	Forma normal del nutriente en el ambiente	Forma suministrada en el medio de cultivo
Carbono (C)	CO ₂ , compuestos orgánicos	Glucosa, malato, acetato, piruvato, aminoácidos, cientos de otros compuestos o mezclas complejas (extracto de levadura, peptona, etc.)
Hidrógeno (H)	H ₂ O, compuestos orgánicos	H ₂ O, compuestos orgánicos
Nitrógeno (N)	NH ₃ , NO ₃ ⁻ , N ₂ , compuestos orgánicos nitrogenados	Inorgánico: NH ₄ Cl, (NH ₄) ₂ SO ₄ , KNO ₃ , N ₂ . Orgánico: aminoácidos, bases nitrogenadas de nucleótidos, muchos otros compuestos con N.
Oxígeno (O)	H ₂ O, O ₂ , compuestos orgánicos	H ₂ O, O ₂ , compuestos orgánicos
Fósforo (P)	PO ₄ ³⁻	KH ₂ PO ₄ , Na ₂ HPO ₄
Azufre (S)	H ₂ S, SO ₄ ²⁻ , compuestos orgánicos azufrados, sulfuros metálicos (FeS, CuS, ZnS, NiS, etc.)	NA ₂ SO ₄ , NA ₂ S ₂ O ₃ , Na ₂ S, cisteína u otros compuestos orgánico azufrados.
Potasio (K)	K ⁺ en solución o como varias sales con K	KCl, KH ₂ PO ₄
Magnesio (Mg)	Mg ²⁺ en solución o como varias sales con Mg	MgCl ₂ , MgSO ₄
Sodio (Na)	Na ⁺ en solución, NaCl o como otras sales con Na	NaCl
Calcio (Ca)	Ca ²⁺ en solución, CaSO ₄ o como otras sales con Ca	CaCl ₂
Hierro (Fe)	Fe ²⁺ o Fe ³⁺ en solución, FeS, Fe(OH) ₃ o como otras sales con Fe	FeCl ₃ , FeSO ₄ , varias soluciones de hierro quelado (Fe ³⁺ EDTA, Fe ³⁺ citrato, etc.

Tomada de Madigan *et al.*, 2002.

8.2.2 Otros macronutrientes: P, S, K, Mg, Ca, Na.

El fósforo se presenta en la naturaleza en forma de fosfatos orgánicos e inorgánicos, y la célula lo necesita fundamentalmente para la síntesis de ácidos nucleicos y fosfolípidos. El azufre se requiere porque es un componente estructural de los aminoácidos cisteína y metionina y porque se presenta en ciertas vitaminas como la tiamina, la biotina y el ácido lipoico, así como en el coenzima A. El azufre sufre una serie de transformaciones en la naturaleza, muchas de las cuales son llevadas a cabo exclusivamente por microorganismos y es utilizado por ellos en varias formas químicas (Madigan *et al.*, 2002).

El potasio es necesario en todos los organismos. Una gran diversidad de enzimas lo requieren específicamente como por ejemplo algunas implicadas en la síntesis de proteínas. El magnesio funciona como estabilizador de los ribosomas, las membranas celulares y los ácidos nucleicos, y también se necesita para la actividad de muchas enzimas. El calcio ayuda a estabilizar la pared celular bacteriana y tienen una importancia fundamental en la resistencia de las endoesporas. El sodio es requerido por algunos microorganismos, aunque no todos, y su necesidad suele ser un reflejo del hábitat del microorganismo. Por ejemplo, el agua de mar tienen un elevado contenido de sodio y los microorganismo marinos normalmente lo requieren para su crecimiento; en cambio otras especies muy relacionadas, pero de agua dulce, crecen bien en ausencia de este elemento (Madigan *et al.*, 2002).

8.2.3 Micronutrientes: elementos traza

Aunque los micronutrientes se requieren en muy pequeñas cantidades son tan importantes para el funcionamiento celular como los macronutrientes. Los micronutrientes son metales, muchos de los cuales tienen una función estructural en varias enzimas. Debido a que la necesidad de estos elementos traza es muy pequeña en cuanto a su concentración, con frecuencia no es necesario añadirlos a los medios de cultivo para cultivar microorganismos en el laboratorio. No obstante, si un medio de cultivo contiene compuestos muy puros, disueltos en agua destilada de alta pureza, puede darse deficiencia de algún elemento traza. En tal caso se añade al medio de cultivo una pequeña cantidad de la solución de metales traza a fin de suministrar los metales necesarios (Madigan *et al.*, 2002).

Tabla 3 Micronutrientes (elementos trazas) necesarios para organismos vivos

Elemento	Forma normal del nutriente en el ambiente
Cromo (Cr)	Requerido por los mamíferos para el metabolismo de la glucosa
Cobalto (Co)	Vitamina B ₁₂ ; transcarboxilasa (bacterias del ácido propiónico)
Cobre (Cu)	En la respiración, citocromo c oxidasa; en fotosíntesis, plastocianina y en algunas superóxido dismutasa.
Manganeso (Mn)	Activador de muchas enzimas; presente en algunas superóxido dismutasa y en la enzima que rompe el agua en fotótrofos oxigénicos
Molibdeno (Mo)	Algunas enzimas que contienen flavinas; nitrogenasa, nitrato reductasa, sulfito oxidasa, DMSO-TMAO reductasas y algunas formato dehidrogenasas.
Níquel (Ni)	La mayoría de las hidrogenasas; coenzima F430 de metanógenos, deshidrogenasa del monóxido de carbono y ureasa.
Selenio (Se)	Formato deshidrogenasas; algunas hidrogenasas y el aminoácido selenocisteína.
Tungsteno (W)	Algunas formato deshidrogenasas y oxotransferasas del los hipertermófilos.
Vanadio (V)	Vanadio nitrogenasa, bromoperoxidasa.
Zinc (Zn)	Anhidrasa carbónica, alcohol deshidrogenasa, RNA y DNA polimerasas y muchas proteínas que se unen al DNA.

Tomada de Madigan *et al.*, 2002.

8.2.4 Factores de crecimiento

Los factores de crecimiento son compuestos orgánicos que como los micronutrientes, se necesitan en muy pequeñas cantidades y sólo por algunas células. Los factores de crecimiento son vitaminas, aminoácidos, purinas y pirimidinas. Aunque la mayoría de los microorganismos son capaces de sintetizar estos compuestos, en algunos casos es necesario suministrarlos en el medio de cultivo. Las vitaminas son los factores de crecimiento que se necesitan con mayor frecuencia. Muchas vitaminas funcionan formando parte de coenzimas. La mayor parte de los microorganismos son capaces de sintetizar todos los componentes de sus coenzimas, pero algunos no lo son y necesitan que se les suministre ciertas partes de estas coenzimas en forma de vitaminas. Las principales vitaminas requeridas por los microorganismos son tiamina (vitamina B₁), biotina, piridoxina (vitamina B₆) y piridoxina (vitamina B₁₂) (Madigan *et al.*, 2002).

Tabla 4 Cofactores enzimáticos y vitaminas

Vitamina	Función
Acido <i>p</i> -aminobenzoico	Precursor del ácido fólico.
Acido fólico	Metabolismo de compuestos de un carbono; transferencia de grupos metilo.
Biotina	Biosíntesis de ácidos grasos; β -descarboxilaciones; algunas reacciones de fijación de dióxido de carbono.
Cobalamina	Reducción y transferencia de restos monocarbonados; síntesis de desoxirribosa.
Acido lipico	Transferencia de grupos acilo en la descarboxilación del piruvato y α -cetoglutarato.
Acido nicotínico (niacina)	Precursor del NAD ⁺ -Nicotinamida adenina dinucleótido-; transferencia de electrones en reacciones de oxidación-reducción.
Acido pantoténico	Precursor de la coenzima A; activación del acetilo y derivados acilados.
Riboflavina	Precursor del FMN - flavin mononucleótido-, FAD - Flavin adenina dinucleótido- en flavoproteínas implicadas en el transporte de electrones.
Tiamina (B1)	α -descarboxilaciones; transcetolasa.
Vitaminas B6 (Grupo piridoxal-piridoxamina)	Transformaciones de aminoácidos y cetoácidos.
Grupo vitaminas K; quinonas	Transporte de electrones; síntesis de esfingolípidos.
Hidroxamatos	Compuestos que unen hierros; solubilización y transporte del hierro al interior celular.

Tomada de Madigan *et al.*, 2002.

8.3 Materias primas

Diferentes materias primas se han utilizado para la elaboración de medios de cultivo líquidos para la multiplicación de microorganismos. Una amplia variedad de subproductos agrícolas e industriales que contienen factores de crecimiento, carbono, en ocasiones nitrógeno y sales han sido utilizados para la multiplicación de microorganismos, por ejemplo: suero de leche, extracto de malta, extracto de levadura grado industrial, melaza, entre otros. Lo importante es la reducción de costos en los procesos de multiplicación de microorganismos ya que los medios sintéticos o definidos son costosos debido a que los reactivos utilizados son de alta pureza (Rebah *et al.*, 2007).

8.4 Formulación

La formulación tiene que ver con los aspectos cuantitativos de los medios, es decir el establecimiento de las cantidades de cada componente necesarias para el crecimiento

del microorganismo objetivo sobre éste. Un primer acercamiento con respecto a las cantidades que se necesitan de cada componente para la elaboración del medio de cultivo es la composición elemental del microorganismo, en general un microorganismo tiene la siguiente composición: $\text{CH}_{1.81}\text{O}_{0.51}\text{N}_{0.21}$, por consiguiente para la obtención de determinada cantidad de biomasa es necesario que en la formulación del medio se provean las distintas fuentes en sus correspondientes cantidades, de tal manera que se asegure la cantidad mínima de nutrientes requeridos (*Comunicación personal, Matiz, 2007*).

9. Diseño de experimentos

Los métodos de diseño de experimentos han encontrado una amplia aplicación en muchas disciplinas. Así, se puede ver experimentación como parte de procesos científicos o como una de las formas en que nosotros aprendemos sobre como los sistemas o procesos trabajan. Generalmente, se aprende a través de una serie de actividades en las cuales se pueden hacer conjeturas sobre un proceso, realizar experimentos para generar datos de un proceso y entonces usar la información proveniente del experimento para establecer nuevas conjeturas, las cuales recaerán en nuevos experimentos y así sucesivamente (Montgomery, 2005).

Los diseños experimentales son una importante herramienta en el mundo científico para mejorar un producto o la realización de los procesos. Los componentes críticos de estas actividades están en la nueva elaboración de diseños de procesos y su desarrollo, y el manejo de procesos. La aplicación temprana de técnicas de diseños experimental en el desarrollo de procesos puede resultar en: 1) mejoramiento de los procesos de producción, 2) reducción de la variabilidad de los procesos, 3) disminución del tiempo de desarrollo y, 4) reducción de costos (Montgomery, 2005).

9.1 Directrices para el diseño de experimentos

Para usar la aproximación estadística en diseño y análisis de experimentos es necesario involucrarse en el experimento para así tener una idea clara de lo que será exactamente estudiado, como los datos a ser colectados y al menos un entendimiento cualitativo de cómo estos datos se analizaran. En general, las directrices para diseñar un experimento son las siguientes: 1) reconocimiento del problema, 2) selección de la variable

respuesta, 3) selección de factores, niveles y rangos, 4) selección de diseño de experimentos, 5) realización de experimentos, 6) análisis estadístico de los datos y, 7) conclusiones y recomendaciones. Las tres primeras etapas corresponden a la planeación pre-experimental (Montgomery, 2005).

9.2 Selección del diseño experimental

La selección de un diseño envuelve consideraciones como el tamaño de muestra (número de réplicas), la selección de un orden adecuado para la ejecución de los ensayos, y la determinación de si otras restricciones de aleatorización están implicadas. En la selección del diseño es importante tener los objetivos experimentales en mente. En muchos experimentos, se conocen ya de antemano algunos de los niveles de los factores que provocaran diferentes valores para la respuesta. En consecuencia, el interés es identificar cuales factores causarán esta diferencia y estimar la magnitud en la que la respuesta cambia. En otras situaciones, se podría estar interesado en verificar uniformidad. Por ejemplo, dos condiciones de producción son comparadas: A y B, donde A es el estándar y B es la alternativa. El experimentador estará interesado en demostrar si hay o no diferencia en la producción dada alguna de las dos condiciones (Montgomery, 2005).

9.3 Diseños experimentales

9.3.1 Diseños de resolución III

El uso secuencial de diseños factoriales fraccionados es muy usado, provocando tanto economía como eficiencia en la experimentación. Esta aplicación de factoriales fraccionados se da frecuentemente en situaciones de screening de un factor puro; esto significa que hay relativamente muchos factores pero sólo unos pocos de ellos se esperan sean importantes. Los diseños de resolución III pueden ser muy usados en estas situaciones (Montgomery, 2005).

Es posible construir diseños de resolución III para investigar $k = N-1$ factores en sólo N corridas, donde N es un múltiplo de cuatro. Estos diseños son usualmente utilizados en la experimentación industrial. Los diseños en los cuales N es una potencia de 2 pueden ser contruidos por diferentes métodos (Montgomery, 2005).

Uno de éstos diseños es el **Plackett-Burman** atribuido a Plackett y Burman (1946), el cual consiste en un diseño factorial fraccionado de dos niveles para estudiar $k = N - 1$ variables en N corridas, donde N es múltiplo de 4. Si N es una potencia de 2, estos diseños no son particulares. Sin embargo, para $N = 12, 20, 24, 28$ y 36 , los diseños Plackett-Burman son en algunas ocasiones de interés. Debido a que estos diseños no pueden ser representados como cubos estos son llamados algunas veces diseños no geométricos. Estos diseños son obtenidos por la escritura apropiada de la columna, para $k = 12$: $++-+++----$. La segunda columna es generada a partir de la primera por el movimiento de los elementos de la columna hacia abajo una posición y colocar el último elemento en la primera posición. Una tercera columna es producida a partir de la segunda columna de la misma manera, y el proceso es continuado hasta la k -ésima columna. Una fila de menos es añadida entonces, completando el diseño (Montgomery, 2005).

9.3.2 Diseños de resolución IV

Un diseño factorial fraccionado 2^{k-p} es de resolución IV si los principales efectos se diferencian de la interacción de dos factores y se dan algunas interacciones entre dos factores. De este modo, si las interacciones entre tres factores son suprimidas, los principales efectos podrían ser estimados directamente de un diseño 2^{k-p} de resolución IV. Cualquier diseño 2^{k-p} de resolución IV debe contener al menos $2k$ corridas. Los diseños de ésta resolución que contienen exactamente ese número de corridas son llamados diseños mínimos (Montgomery, 2005).

9.3.3 Diseños de superficie de respuesta: Box-Behnken

Cuando se selecciona un diseño de superficie de respuesta, algunas de las características de un deseable diseño son las siguientes: 1) Provee una razonable distribución de puntos de datos a través de la región de interés, 2) permite la adecuación del modelo, incluyendo la falta de ajuste, para ser investigado, 3) permite que los experimentos sean realizados en bloque, 4) permite construir de forma secuenciada diseños de alto orden, 5) proveen un error interno estimado, 6) provee estimación precisa de los coeficientes de los modelos, 7) provee un buen perfil de la predicción de la varianza a través de la región experimental, 8) no requiere un gran número de corridas, 9) no requiere muchos niveles de las variables independientes (Montgomery, 2005).

Box y Behnken (1960) propusieron algunos diseños de tres niveles para adecuar superficies de respuesta. Estos diseños son formados por la combinación de factoriales 2^k con diseños de bloques incompletos. El diseño resultante es usualmente muy eficiente en términos del número de corridas requeridas y cualquiera de ellos es rotatable o cercanamente rotatable. Éste diseño es un diseño esférico con todos los puntos perteneciendo a una esfera de radio $\sqrt{2}$. También, este diseño no contiene puntos en los vértices de la región cúbica creada por el límite más alto y más bajo para cada variable. Esto puede ser ventajoso cuando los puntos en las esquinas del cubo representan combinaciones de factores-nivel que son prohibitivamente costosos o imposibles de evaluar por limitaciones en procesos físicos (Montgomery, 2005).

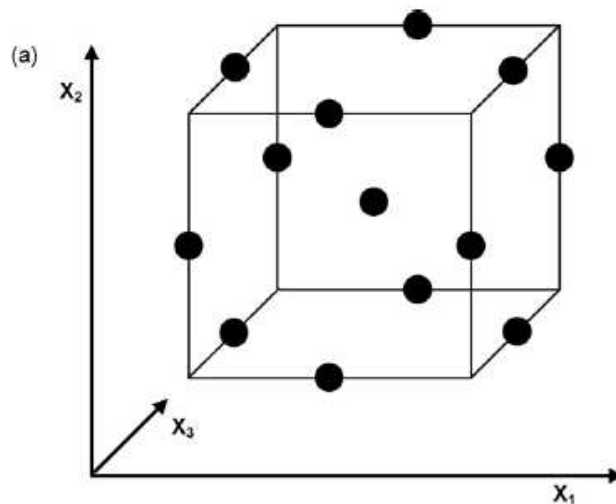


Figura 1 Diseño Box – Behnken. Tomado de Ferreira *et al.*, 2007.

Metodología

1. Cepas de estudio

Las cepas C50 y T14 de *Rhizobium* sp. y la cepa J01 de *Bradyrhizobium* sp. se obtuvieron del Banco de Germoplasma de Microorganismos con Potencial Biofertilizante del Laboratorio de Microbiología de Suelos del Centro de Biotecnología y Bioindustria – CBB- Corpoica C.I Tibaitatá. La cepa C2 fue suministrada por el autor. Se usó la cepa C50 para todos los ensayos relacionados con el diseño del medio de cultivo debido a la finalidad del proyecto financiador. Se realizó la caracterización fenotípica de las cepas de estudio.

1.1 Reactivación del inóculo y medio de cultivo

La reactivación de las cepas se llevó a cabo en placas de petri con medio de cultivo Levadura-Manitol-Agar –LMA- (g/L: 10 Manitol, 0.5 Extracto de levadura, 0.5 K₂HPO₄, 0.2 MgSO₄, 0.1 NaCl, 18 Agar; pH = 6.8-7.0) mediante la técnica de siembra por agotamiento. Los tiempos de incubación fueron 48h para las cepas de *Rhizobium*, 120h para la J01 de *Bradyrhizobium* y 168h para la cepa C2, la temperatura se ajustó en $28 \pm 2^\circ\text{C}$. Para confirmar la pureza de la cepa se realizó coloración de Gram.

2. Estandarización del inóculo

2.1 Curva de peso seco

Se preparó un inóculo de 150mL con la cepa C50 en caldo –LM- (g/L: 10 Manitol, 0.5 Extracto de levadura, 0.5 K₂HPO₄, 0.2 MgSO₄, 0.1 NaCl; pH = 6.8-7.0) con un periodo de incubación de 32h, temperatura de $28 \pm 2^\circ\text{C}$ y 150rpm en un agitador orbital. Posteriormente 100mL de inóculo se llevaron a centrifugación a 6000rpm durante 10 min. descartando el sobrenadante, y se resuspendieron las células en solución salina estéril – SS- (NaCl, 0.85%) hasta completar un volumen de 100mL, esto se hizo dos veces. La suspensión celular se repartió en tubos de ensayos con peso inicial conocido (10mL/tubo de ensayo) y se utilizaron 5 tubos de ensayo adicionales con solución salina estéril (10mL) para determinar el peso de ésta en la suspensión celular previamente preparada. Todos los tubos fueron llevados al horno a una temperatura de

105°C durante 24 h, y se pesaron nuevamente, los datos fueron registrados cuando el peso de los tubos fue constante, las 15 mediciones se hicieron por triplicado. Para el cálculo del peso seco se utilizó la siguiente expresión:

$$Bm_{ps} i = T_{susp.} i - \hat{T}_{ss} - T_{vacío} i \quad (2)$$

Donde Bm_{ps} es la biomasa en peso seco, $T_{susp.} i$ es el peso de cada tubo con suspensión celular, \hat{T}_{ss} es el peso promedio de los tubos con solución salina y $T_{vacío} i$ es el peso de cada tubo vacío, i es el valor de referencia para cada tubo. Se promediaron los diez tubos, este valor se multiplicó por el factor de corrección y se obtuvo la concentración del peso seco de biomasa en el inóculo inicial (150mL), además se promediaron los pesos de los cinco tubos con solución salina para la realización de los cálculos pertinentes.

Por otra parte, se tomó el cultivo restante (50mL), se prepararon diluciones seriadas (1/2, 1/3, 1/4, 1/5, 1/6, 1/8, 1/10, 1/20 y 1/50) y se midió absorbancia en un espectrofotómetro (Genesy, USA) a $\lambda=540\text{nm}$ para realizar la curva patrón de peso seco, se empleó el medio –LMA- estéril como blanco.

2.2 Cinética Preliminar de Crecimiento del Microorganismo

Se preparó una suspensión celular en solución salina estéril (NaCl 0.85%) a partir de una caja con la cepa C50 previamente crecida y se usó espectrofotometría y la curva de peso seco para obtener una concentración de 2g de células /L de inóculo. Se preparó un inóculo con un volumen final de 250mL en medio –LM- y relación 1/4, con un porcentaje de pre-inóculo del 1%, esto se realizó por triplicado con temperatura de incubación de $28 \pm 2^\circ\text{C}$ y 150rpm. Se determinó la absorbancia en cada inóculo a intervalos de dos horas durante la primera fase de crecimiento, cuando se evidenció la presencia de la fase exponencial se muestreó cada hora. La curva fue detenida cuando el valor de absorbancia fue similar en tres mediciones consecutivas reflejando el inicio de la fase estacionaria.

2.3 Generación de la Colección de Trabajo

Se preparó un inóculo de 150mL con la cepa C50 en medio –LM-, con un periodo de incubación de 24 h a $28 \pm 2^\circ\text{C}$. El inóculo se repartió en 120 viales con un volumen

final de 1mL/vial para generar el banco mediante la técnica de crioconservación a -20°C en glicerol al 30%, según técnica estandarizada por el Laboratorio de Microbiología de Suelos del -CBB – Corpoica, Tibaitatá. Para verificar la estabilidad del banco se tomaron cuatro viales por muestreo, teniendo en cuenta la siguiente fórmula (Pedroza *et al.*, 2006):

$$n = \frac{2}{5} \sqrt{N} \quad (3)$$

Donde N es el número de viales del banco y n es el número de elementos a muestrear. Se verificó la viabilidad celular posterior a la crioconservación mediante la técnica de recuento en placa en medio -LMA-. Se muestreó a las 0, 1, 8, 15, 30, 60 y 120 días.

2.4 Estandarización del inóculo para los ensayos del medio de cultivo

En 99mL de caldo de cultivo -LM-, se adicionó el pre-inóculo a razón de un 1% de su volumen efectivo de trabajo lo que es correspondiente al contenido de un vial (1mL) y se llevó a incubación a $28 \pm 2^\circ\text{C}$ y 150rpm durante 20 horas. Posterior a esto, se llevó el cultivo a centrifugación a 6000 rpm durante 10 min. y se resuspendió a un cuarto de su volumen inicial con solución salina estéril (NaCl 0,85%). Se tomaron 3mL de la suspensión y se determinó la absorbancia con el fin de calcular la concentración de peso seco de biomasa usando la curva de peso seco y se ajustó así el cultivo a 2g de células/L de suspensión. La suspensión resultante se empleó en cada uno de los tratamientos generados en cada uno de los diseños estadísticos subsecuentes a razón del 1% del volumen.

3. Fuentes de crecimiento

3.1 Obtención de las fuentes de crecimiento

Se probaron tres fuentes de carbono de diferente procedencia industrial: glicerol, sacarosa y melaza, y cuatro fuentes de nitrógeno -dos industriales y dos agrícolas-: glutamato, extracto de levadura, soya, cloruro de amonio y además sales. La selección de estos se realizó con base en las características metabólicas del microorganismo, los reactivos fueron provistos por el Laboratorio de Microbiología de Suelos del C.I. Tibaitatá – Corpoica.

3.2 Cálculo del carbono total y nitrógeno total en las fuentes de crecimiento

Se realizó el análisis de carbono y nitrógeno total a la melaza, extracto de levadura y extracto de soya en el laboratorio de Química de Suelos del C.I. Tibaitatá – Corpoica, utilizando las técnicas estandarizadas por el mismo laboratorio. Para los otros sustratos, el valor se obtuvo mediante los datos suministrados por el proveedor o productor.

4. Screening primario

Se aplicó un diseño de Plackett Burkman (Plackett y Burman, 1946) con 8 factores: cuatro fuentes de nitrógeno (glutamato, levadura, soya y cloruro de amonio), tres de carbono (glicerol, sacarosa y melaza) y sales para determinar su influencia sobre el crecimiento del microorganismo. Cada variable fue evaluada a dos niveles: bajo y alto, denominados (-1) y (+1), respectivamente, en 12 experimentos por triplicado. El número de +1 y -1 fue igual por columna, seis para cada uno (Tabla 5). Para determinar los niveles de evaluación, se tuvo en cuenta el carbono y nitrógeno total del medio estándar y la de los sustratos seleccionados ensayando 50 y 150% de concentración de carbono para las fuentes posibles de carbono y 60 y 140% para las definidas como fuente nitrógeno, las sales se evaluaron en el nivel del medio –LM- y al 20% (Tabla 6). El pH se ajustó a 6.8 ± 0.2 como en el medio tradicional. Los erlenmeyer se llevaron a incubación a $28 \pm 2^\circ\text{C}$ y 150 rpm durante 20 h, de acuerdo a lo establecido con la cinética preliminar de crecimiento. Las concentraciones se ajustaron de tal manera que la suma de carbono total de las fuentes seleccionadas para carbono no superaran la el carbono total del medio tradicional, lo mismo se hizo con las fuentes seleccionadas de nitrógeno (Comunicación personal, Díaz, 2008) (Tabla 6).

Tabla 5 Diseño del Experimento Plackett-Burman

Corrida	Factores codificados ^{1,2}							
	C1	C2	C3	N1	N2	N3	N4	S
1	+1	+1	-1	+1	+1	-1	+1	-1
2	-1	-1	-1	+1	+1	+1	-1	+1
3	+1	+1	-1	+1	-1	-1	-1	+1
4	-1	+1	-1	-1	-1	+1	+1	+1
5	-1	+1	+1	+1	-1	+1	+1	-1

6	-1	-1	+1	+1	+1	-1	+1	+1
7	+1	-1	-1	-1	+1	+1	+1	-1
8	+1	-1	+1	+1	-1	+1	-1	-1
9	-1	+1	+1	-1	+1	-1	-1	-1
10	+1	-1	+1	-1	-1	-1	+1	+1
11	+1	+1	+1	-1	+1	+1	-1	+1
12	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1

¹Las concentraciones y la codificación están relacionadas en la tabla 6. ²Las fuentes fueron codificadas así: C1: glicerol, C2: sacarosa, C3: melaza, N1: glutamato, N2: extracto de levadura, N3: Extracto de soya y N4: Cloruro de amonio (NH₄Cl).

Tabla 6 Experimento de Plackett-Burman: niveles factor.

Factores	Concentraciones estándar: Nivel bajo (g/L) ¹	Concentraciones estándar: Nivel alto (g/L) ¹	Concentraciones ajustadas: Nivel bajo (g/L) ¹	Concentraciones ajustadas: Nivel bajo (g/L) ¹
C1	3,78	11,34	1,26	3,78
C2	4,75	14,25	1,58	4,75
C3	2,96	8,88	0,99	2,96
N1	0,36	0,85	0,09	0,21
N2	0,40	0,93	0,10	0,23
N3	0,51	1,19	0,13	0,30
N4	0,11	0,27	0,03	0,07
S	0,2	0,4	0,5	0,1

¹Las concentraciones estándar corresponden a la concentración de cada fuente de crecimiento con la misma concentración de carbono del medio –LM- si es C1, C2 o C3, y la misma de nitrógeno si es N1, N2, N3 o N4 Las concentraciones ajustadas corresponden a las usadas para el diseño del medio –Plackett Burman-.

En cada tratamiento se evaluó un volumen final de medio de cultivo de 30mL manteniendo una relación aproximada de 1/5, esta evaluación se realizó por triplicado. Los tratamientos se inocularon con una suspensión hecha como se describe en el numeral 2.4 de la metodología. La medición de la concentración celular se llevó a cabo por la técnica de recuento en placa en medio –LMA-. El diseño fue generado mediante el Software estadístico Statgraphics Plus 5.1.

5. Screening Secundario y Selección de fuentes

5.1 Screening secundario I

Con el fin de acercarse a la concentración óptima de sustratos que maximizan la producción de biomasa y disminuir la cantidad de sustratos usados, se seleccionaron los cinco sustratos que resultaron más significativos sobre el crecimiento del microorganismo teniendo en cuenta las características metabólicas de la cepa, costo económico y disponibilidad de los sustratos. Se aplicó un diseño factorial fraccionado de dos niveles y cinco factores: melaza, glicerol, glutamato, levadura y sales, con un total de ocho ejecuciones -tratamientos- por triplicado. Para el desarrollo experimental se usó la misma metodología empleada en el Screening primario. Se trabajó un nivel de significancia del 95%. Las concentraciones de los sustratos fueron las mismas usadas en el Screening primario.

5.2 Screening secundario II

Se utilizó un diseño factorial fraccionado de tres niveles, con un punto central (0). Cada ensayo constó de cinco tratamientos y la evaluación se hizo por triplicado. Los factores evaluados fueron melaza, glutamato y extracto de levadura. Se trabajó un nivel de significancia del 95% y las concentraciones usadas variaron de acuerdo con los resultados del diseño anterior. Para el desarrollo experimental se usó la misma metodología empleada en el Screening primario.

6. Diseño de optimización: Box – Behnken

Se empleó el diseño de superficie de respuesta Box – Behnken (Box y Behnken, 1960), el cual fue llevado a cabo con tres factores: glutamato, extracto de levadura y melaza; y a tres niveles: bajo (-1), medio (0) y alto (+1). El ensayo constó de 15 tratamientos y se llevó a cabo por triplicado. Se trabajó un nivel de significancia del 95% y se siguió la misma metodología del Screening Primario. Las concentraciones usadas variaron de acuerdo con los resultados del diseño anterior. Para evaluar la variable de respuesta se empleó un análisis de regresión con el fin de obtener un modelo empírico que relacione la respuesta medida para las variables independientes. La relación entre éstas y la respuesta fue calculada mediante la ecuación polinomial de segundo orden:

$$Y = \beta_o + \sum_{i=1}^k \beta_i X_i + \sum_{i=1}^k \beta_{ii} X_i X_i + \sum_{i < j} i \sum j \beta_{ij} X_i X_j \quad (4)$$

Donde Y es la respuesta predicha, β_o una constante, β_i el coeficiente lineal, β_{ii} el coeficiente cuadrado y β_{ij} el coeficiente del producto cruzado, k es el numero de factores (Jian-Zhong *et al.*, 2003).

7. Comparación de la cinética de crecimiento en los medios de cultivo tradicional y alterno

Se empleó la misma metodología descrita en el numeral 2.2 para la elaboración de la curva de crecimiento sobre el medio –LM-; en ésta ocasión se realizó la cinética de la bacteria sobre el mismo medio y sobre el medio alterno. Se muestreó durante un periodo de 72 horas.

8. Prueba de estabilidad acelerada –preliminar- en turba

Se pesaron bolsas de polietileno de alta densidad con 400g de turba de origen colombiano previamente caracterizada, molida, seca, esterilizada dos veces a 121° C y 15 lb de presión durante 1 h. Previamente neutralizada con carbonato de calcio (CaCO₃). Paralelo a esto, se prepararon dos cultivos de 600mL de la cepa C50 manteniendo una relación 1/5, durante 20 h a 150 rpm y 28 ± 2°C, uno en el medio –LM- y el otro en el medio alterno. Se inyectaron cinco bolsas con 100mL del inóculo crecido en el medio tradicional (T1) y las otras cinco bolsas con 100mL del inóculo crecido en el medio alterno (T2). Las bolsas inoculadas fueron llevadas a incubación durante 24h, a una temperatura de 28 ± 2°C, y se evaluó la concentración celular. Las bolsas se dejaron en refrigeración a 4 ± 2°C durante el tiempo de estudio. Las lecturas de estabilidad se realizaron a los 15, y 30 días, mediante la misma técnica. Como control negativo se inoculó 100mL de cada medio de cultivo estéril en dos bolsas. Para evaluar la presencia de diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos se realizó una prueba de comparación de medias -prueba de Tukey- con 95% de confianza.

9. Evaluación del medio alterno sobre el crecimiento de otras cepas de rizobios

*9.1 Evaluación del crecimiento de la cepa T14 de *Rhizobium* sp. sobre el medio alterno.*

Se preparó un inóculo de la cepa T14 de *Rhizobium* sp. en un erlenmeyer de 125mL, con relación 1/5 durante 48 h a 150 rpm y $28 \pm 2^\circ\text{C}$ en medio –LM-. Se inoculó a razón de 1% del volumen en un erlenmeyer con medio de cultivo alterno y otro con –LM-, y se llevaron a incubación durante 24 h a 150 rpm y $28 \pm 2^\circ\text{C}$, posterior a esto se estimó la población celular mediante la técnica de recuento en placa. Cada ensayo se hizo por triplicado y se realizó una prueba de comparación de medias –prueba t - para el análisis de los datos obtenidos.

*9.2 Evaluación del crecimiento de las cepa C2 y la J01 de *Bradyrhizobium* sp. sobre el medio alterno*

Se preparó un inóculo de cada una de las cepas en un erlenmeyer de 125mL, con relación 1/5 durante 120 h para J01 y 144 h para C2 a 150 rpm y $28 \pm 2^\circ\text{C}$ en medio –LM-. Se inoculó a razón de 1% del volumen los erlenmeyer con medio de cultivo alterno y –LM-, y se llevaron a incubación durante 120 h para J01 y 144 h para C2, a 150 rpm y $28 \pm 2^\circ\text{C}$, posterior a esto se estimó la población celular mediante la técnica de recuento en placa. Cada ensayo se hizo por triplicado y se realizó una prueba de comparación de medias –prueba t- para el análisis de los datos obtenidos.

10. Análisis de costos

Se calcularon los costos de producción de ambos medios de cultivo y se llevó a cabo el análisis respectivo.

11. Software

Los diseños experimentales usados y los análisis estadísticos realizados fueron generados y ejecutados con el Software estadístico Statgraphics (Versión 5.1, Statistics Graphical Corporation, USA).

También se usaron el procesador de texto Microsoft Word 2003 (Microsoft Corporation, USA) y la hoja de cálculo Microsoft Excel 2003

Resultados y Discusión

1. Descripción fenotípica de las cepas empleadas

La descripción fenotípica de las cepas obtenidas del Banco de Germoplasma de Microorganismos con Potencial Biofertilizante junto a la cepa C2 obtenida por el autor (2008) a partir de la leguminosa forrajera Campanita *Clitoria ternatea* en la región del Valle de Cesar, en los medios de cultivo –LMA- con rojo congo y –LMA- con azul de bromotimol se relacionan en las tablas 7-9.

Tabla 7 Descripción microscópica de las cepas de rizobios

Cepa	Descripción microscópica
<i>Rhizobium</i> sp. C50	Bacilos Gram-negativos. Pequeños
<i>Rhizobium</i> sp. T14	Bacilos Gram-negativos.
<i>Bradyrhizobium</i> sp. J01	Bacilos Gram-negativos.
C2 ¹	Bacilos Gram.-negativos. Pequeños, pleomórficos.

¹La cepa C2 ha sido confirmada como rizobio mediante el test de nodulación; sin embargo, no se tiene la caracterización molecular ni bioquímica de la cepa por lo tanto se enuncia sólo su codificación.

Tabla 8 Descripción macroscópica de las cepas de rizobios en medio –LM- + azul de bromotimol

Cepa	Descripción macroscópica ¹								
	TDC	FAA ²	TC	CC	TR	EL	FC	FM	B
<i>Rhizobium</i> sp. C50	3	Ac	R	A	T	C	R	P	Li
<i>Rhizobium</i> sp. T14	2-3	Ac	R	A	T	C	R	P	Li
<i>Bradyrhizobium</i> sp. J01	2	Ac	M	A	O	C	R	P	Li
C2	1	Al	L	Az	O	C	R	A	Li

¹TDC – tamaño de las colonias en mm; FAA – formación de ácido o álcali (descripción de las cepas en –LMA- + Azul de bromotimol; Ac: ácida, Al: alcalina, N: neutra); TC – tiempo de crecimiento (R: rápido, L: lento); CC – color de las colonias (V: verde, A: Amarilla, Az: Azul, T: transparente); TR – transparencia (O: opaca, T: translúcida); EL – elevación (C: convexa); FC – forma de las colonias (R:redondas, I: irregular); FM – formación de moco (A: ausente, P: presente); B – borde (Li: Liso, Ru: Rugoso). ²El indicador azul de bromotimol es azul si el pH es superior a 7.6, verde si está entre 6.6-7.6 y amarillo si el pH es inferior a 6.6. Para la evaluación del viraje del medio el tiempo de incubación fue de 72 h para las cepas de crecimiento rápido y 168 h para las de crecimiento lento.

Tabla 9 Descripción macroscópica de las cepas de rizobios en medio –LM- + azul de bromotimol

Cepa	Descripción macroscópica ¹
------	---------------------------------------

	TDC	AC	TC	CC	TR	EL	FC	FM	B
<i>Rhizobium</i> sp. C50	3	Le	R	Ros	T	C	R	P	Li
<i>Rhizobium</i> sp. T14	2-3	Le	R	Ros	T	C	R	P	Li
<i>Bradyrhizobium</i> sp. J01	2	Le	M	Ros	O	C	R	P	Li
C2	1	Ab ²	L	R ²	O	C	R	A	Li

¹TDC – tamaño de las colonias en mm; AC – absorción del colorante (Ab: abundante, Le: leve, N: nula); TC – tiempo de crecimiento (R: rápido, M: medio, L: lento); CC – color de las colonias (R: Roja, Ros: Rosada; B: Blanca, T: transparente); TR – transparencia (O: opaca, T: translúcida); EL – elevación (C: convexa); FC – forma de las colonias (R:redondas, I: irregular); FM – formación de moco (A: ausente, P: presente); B – borde (Li: Liso, Ru: Rugoso).²Las colonias toman coloración roja intensa luego de ocho días de incubación.

Esta caracterización concuerda con lo reportado por Kuykendall *et al.* (2005) y Kuykendall (2005), quienes describen a las bacterias del género *Rhizobium* como bacilos Gram-negativos no esporoformadores, con colonias de 2.0-4.0 mm de diámetro dentro de los 2-5 días posteriores a la incubación sobre medio –LMA- y productoras de polisacáridos extracelulares. En la mayoría de los casos generan una reacción ácida sobre medio –LMA- con azul de bromotimol. Usualmente las colonias son blancas o beige, circulares, convexas, semitranslúcidas u opacas, lisas y mucilaginosas. Las bacterias del género *Bradyrhizobium* son caracterizadas como bacilos Gram-negativos no esporoformadores, de colonias circulares, opacas, raramente translúcidas, blancas y convexas, que no exceden 1.0 mm de diámetro luego de 5-6 días de incubación. Generalmente, producen una reacción alcalina sobre el medio –LMA- con azul de bromotimol.

2. Estandarización del inóculo

2.1 Curva de peso seco

Mediante la técnica de peso seco se obtuvo que la concentración del inóculo inicial de la cepa C50 fue 1.230 g/L y a partir de esta se obtuvo la curva patrón donde se evaluó la absorbancia vs. la concentración celular (Fig. 2).

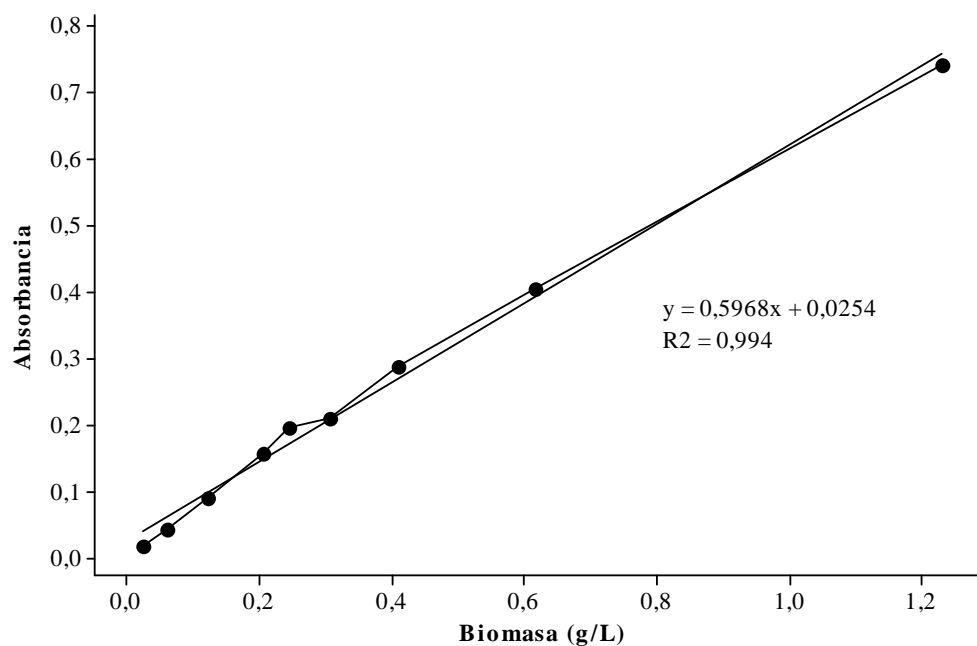


Figura 2 Curva de peso seco para *Rhizobium* sp. cepa C 50.

Los resultados mostraron que existe una relación estadísticamente significativa ($p < 0.01$) entre las dos variables: absorbancia y concentración. Para el cálculo de la recta de regresión lineal se usó el método de los mínimos cuadrados. El valor estadístico R-cuadrado indica que el modelo explica en un 99.394% la variabilidad de la concentración de la biomasa, por otra parte el coeficiente de correlación es igual a 0.997 afirmando que existe una relación relativamente fuerte entre las variables lo cual confirma la ley de Beer-Lambert que afirma que la absorbancia es directamente proporcional al producto entre la absorptividad de la muestra, su concentración y el espesor de la celda (Torrenegra, 2004)

La ecuación de regresión obtenida fue:

$$y = 0.5968x + 0.0254; R^2 = 0.994 \quad (5)$$

Esta curva fue empleada en los experimentos posteriores.

2.2 Curva preliminar de crecimiento del microorganismo

Se obtuvo la cinética de crecimiento de la cepa C50 (Fig. 3). La curva fue realizada durante 22 horas ya que el valor de absorbancia fue similar en las últimas cuatro

mediciones realizadas: 16, 17, 19 y 22 horas; donde no se encontraron diferencias estadísticamente significativas ($p>0.05$), confirmando que el microorganismo se encontraba en fase estacionaria. La fase exponencial terminó en la hora 16. En este caso particular no fue posible evidenciar una diauxia ya que el medio -LMA- posee una sola fuente de carbono.

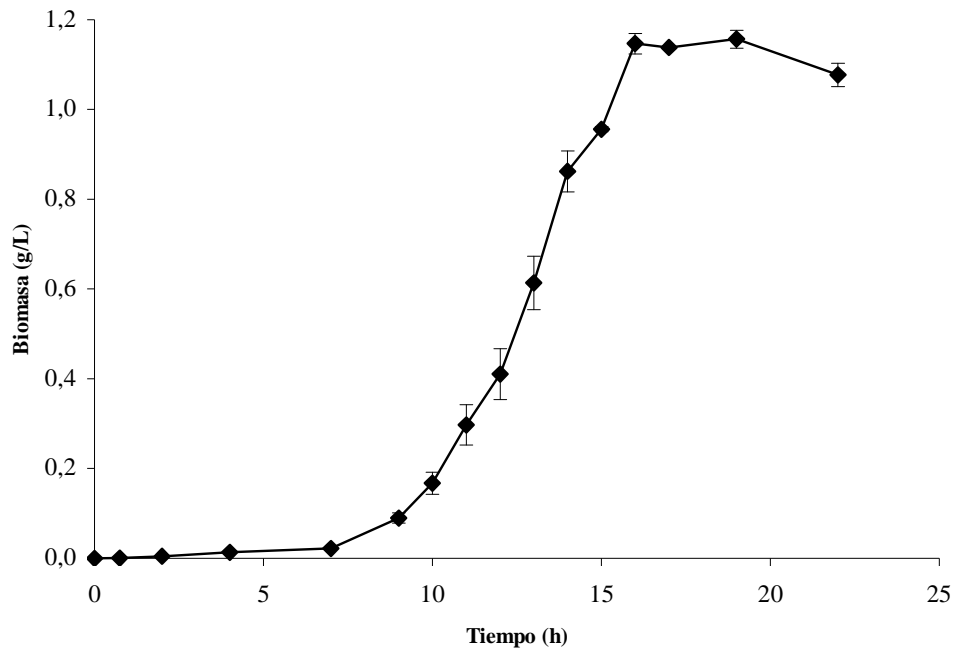


Figura 3 Curva de crecimiento de *Rhizobium* sp. cepa C 50

La obtención de la curva de crecimiento tiempo vs. biomasa expresada en g/L permitió calcular los parámetros cinéticos: velocidad específica de crecimiento y tiempo de duplicación (tabla 10). Se verificó el tipo de cinética de crecimiento del microorganismo, para esto se linealizó la fase exponencial en la cinética de crecimiento, seleccionando desde la hora 2 hasta la 16 y se calculó la recta de regresión (Fig. 4).

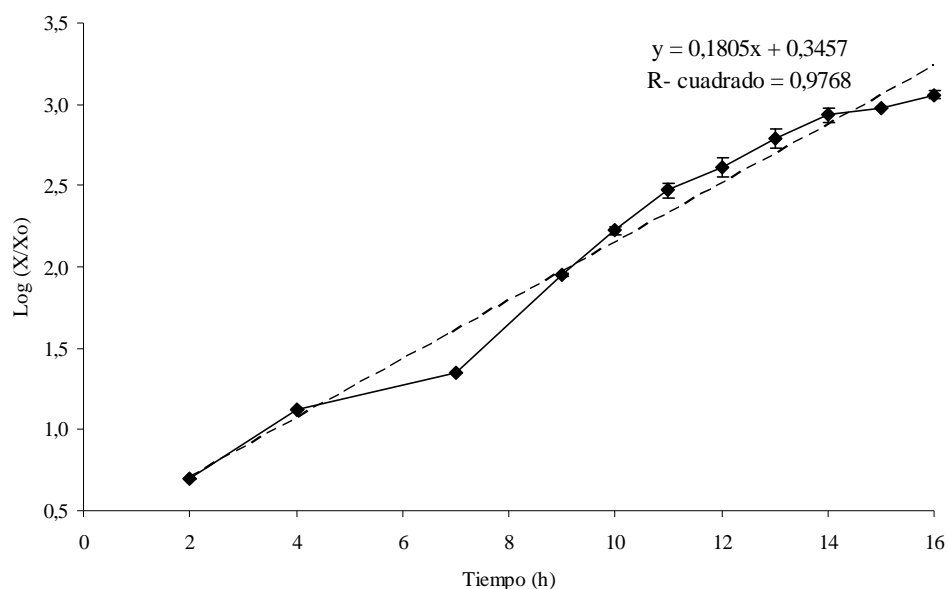


Figura 4 Tiempo vs. $\ln(X/X_0)$ y ecuación de regresión lineal. Donde X_0 representa el valor inicial de biomasa diferente de 0,0 y X_i la medición de biomasa en el tiempo i

La ecuación de regresión obtenida fue:

$$y = 0.1805x + 0.3457; R^2 = 0.9768 \quad (6)$$

Existe evidencia estadísticamente significativa que asegura que existe relación entre las variables ($p < 0.01$). El estadístico R-cuadrado indica que el modelo explica un 97,681% de la variabilidad de la variable dependiente, el valor de r fue de 0.976 mostrando que existe una relación relativamente fuerte entre las variables. Como el estadístico R-cuadrado es mayor a 0.9, se puede asegurar que la cinética es de orden uno, es decir, el microorganismo responde a una cinética de tipo exponencial. De esta manera se calculó: tiempo de duplicación $-t_d-$ y velocidad específica de crecimiento $-\mu_x-$ (Tabla 10).

Tabla 10 Parámetros cinéticos

Parámetro	Valor
Tiempo de duplicación	3,840 h
Velocidad específica de crecimiento	0,181 h ⁻¹

2.3 Colección de Trabajo

Durante los primeros 60 días no hubo pérdida significativa de viabilidad, aún más se observó un incremento en la concentración durante el periodo del día 30 al día 60 ($p < 0.05$), con un recuento superior a 1×10^{11} UFC/mL (Fig. 5). La prueba de comparación de medias de Tukey mostró que no hubo diferencia estadísticamente significativa entre los recuentos del día 0 al día 30 ($p > 0.05$), pero si hubo una pérdida significativa de viabilidad entre el día 60 y el 120 ($p < 0.05$). Es posible que esta disminución en la viabilidad celular haya sido ocasionada por fluctuaciones de la temperatura en el equipo de refrigeración, pues la viabilidad se perdió en los últimos 60 días de evaluación lo que sugiere que la técnica fue apta en los primeros dos meses de evaluación, es decir, superó la fase crítica del método, lo cual confirma la presencia de algún agente externo que pudo afectar la viabilidad celular con una disminución cercana al 99% (Weiser y Osterud, 1945). La pérdida de la viabilidad se reportó con el recuento aritmético debido a que la forma alterna usada: recuento logarítmico, no proporciona un valor real de la disminución de la población celular (Morgan *et al.*, 2006). Durante el tiempo de evaluación de la colección de trabajo, se mantuvo la pureza en 100%.

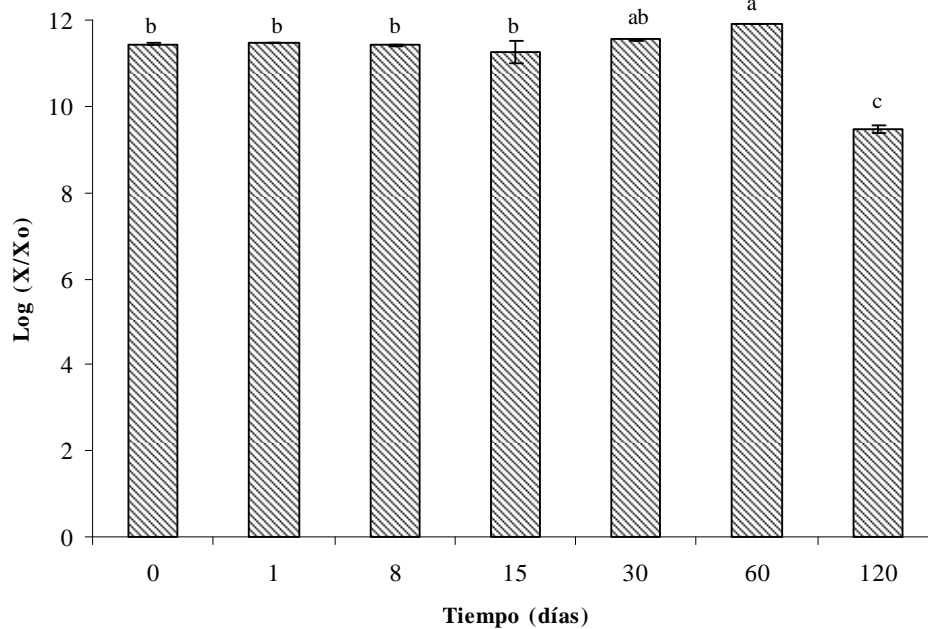


Figura 5 Viabilidad celular posterior a la crioconservación.

Así, el uso de glicerol (30%) no afectó de forma significativa la viabilidad celular, esto es evidente ya que durante el tiempo de evaluación el recuento de UFC disminuyó únicamente una unidad logarítmica, lo cual, según Bozoglu *et al.*, (1987), es “suficiente” para permitir la continuación de la conservación de la cepa. De esta forma, se puede asegurar que bajo las condiciones del laboratorio, este compuesto sirvió como agente crioprotectante para la preservación de la cepa C50.

El glicerol actuó disminuyendo el punto de congelamiento del agua y los fluidos biológicos por acción coligativa (Glicerol/agua a un mínimo de -46°C), Por consiguiente, el glicerol disminuyó la concentración de sales disueltas en la solución, inhibiendo así el choque osmótico. Este agente también previene la cristalización eutéctica. Por otra parte, diagramas de fase han mostrado que la actividad protectante de compuestos como el glicerol podría ser causada por la habilidad de estos agentes para prevenir el congelamiento eutéctico perjudicial de los fluidos de las células por la captura de las sales en una fase altamente viscosa o fase vidrio (Hubálek, 2003).

3. Sustratos

3.1 Determinación del contenido de carbono y nitrógeno total en las fuentes de crecimiento

Las concentraciones de carbono y nitrógeno total de algunas de las fuentes de crecimiento fue determinada por el Laboratorio de Química de Suelos del C.I. Tibaitatá – Corpoica, para los otros se usó la ficha técnica propia de la fuente (Tabla 11).

Tabla 11. Carbono y nitrógeno total. Relación carbono-nitrógeno (C/N) de los sustratos empleados.

Fuente	% Carbono	% Nitrógeno	C/N
Glicerol	52,9	<0,01	52,9
Sacarosa	42,1	<0,01	42,1
Melaza	67,5	0,16	421,9
Glutamato	35,4	8,27	4,3
Ext. levadura	84,8	7,52	11,3
Ext. Soya	72,1	5,88	12,3
NH ₄ Cl	0,0	0,26	0,0

Para la selección de los sustratos se verificó que la fuente seleccionada estuviera disponible para la cepa en el medio de cultivo, así los sustratos C1, C2 y C3 pueden ser metabolizados vía Glucólisis y Ciclo de Krebs y los N1 – N4 en sus radicales nitrogenados vía reacciones de aminación y transaminación (Matheus *et al.*, 2002).

4. Screening primario – SP-

Mediante la aplicación del análisis de regresión se generó la siguiente ecuación lineal (Ec. 7):

$$Y = 4,97786E+10 - 5,22306E+9 * C1 + 5,04722E+8 * C2 + 7,70306E+9 * C3 - 2,32139E+9 * N1 - 6,30306E+9 * N2 - 1,41667E+7 * N3 + 1,90472E+9 * N4 - 1,25508E+10 * S \quad (7)$$

Los valores de predicción fueron comparados con los valores experimentales, algunos fueron cercanos mientras que otros distaron bastante, esto pudo deberse a que el experimento presentó un alto coeficiente de variación en cada una de sus corridas lo cual habla de la poca robustez estadística que representan algunos de los métodos tradicionales que se emplean para su cuantificación (Tab. 12).

Tabla 12 Experimento de Plackett-Burman y resultados con niveles factor.

Corrida	Valor observado (UFC/mL) ¹	CVE ²	Valor predicho (UFC/mL) ¹	CVP ²
1	3,39E+10	54,284%	4,322E+10	25,021%
2	2,18E+10	59,514%	2,369E+10	45,645%
3	3,63E+10	52,779%	2,690E+10	40,202%
4	5,47E+10	25,213%	4,566E+10	23,679%
5	7,25E+10	67,741%	8,159E+10	13,252%
6	4,49E+10	50,543%	4,296E+10	25,172%
7	5,61E+10	55,368%	4,680E+10	23,106%
8	7,55E+10	13,935%	6,641E+10	16,282%
9	8,64E+10	20,541%	6,990E+10	15,468%
10	4,78E+10	86,565%	4,974E+10	21,737%
11	1,78E+10	89,581%	3,431E+10	31,517%
12	4,96E+10	50,793%	6,607E+10	16,365%

¹ Son la media de tres mediciones. ²CVE: coeficiente de variación experimental, CVP: coeficiente de variación predicho, ambos son iguales al cociente entre la desviación estándar y la media aritmética.

El ensayo mostró que los factores de prueba evaluados no presentaron influencia significativa sobre el crecimiento del microorganismo ($p > 0.05$) (Tab. 13).

Tabla 13 Efectos y análisis de variables por método estadístico.

Fuente	GL1	Efecto estimado	Suma de cuadrados	Radio – F	<i>P</i>
C1	1	-10,44E+9	9,82E+20	0,56	0,4625
C2	1	1,01E+9	9,17E+18	0,01	0,9431
C3	1	15,40E+9	2,13E+21	1,21	0,2816
N1	1	-4,64E+9	1,93E+20	0,11	0,7429
N2	1	-12,60E+9	1,43E+21	0,81	0,3765
N3	1	-2,83E+7	7,22E+15	0,00	0,9984
N4	1	3,81E+9	1,30E+20	0,07	0,8510
S	1	-25,10E+9	5,67E+21	3,21	0,0846

¹GL: Grados de libertad. El error estándar fue de $\pm 4,20E10$. El nivel de significancia trabajado fue del 95%.

Como ninguno de los factores resultó significativo se usaron criterios como costo económico y disponibilidad para seleccionar así los sustratos que se utilizarían en el medio de cultivo alterno. Se escogieron cinco factores, dos fuentes de carbono: glicerol y melaza, dos de nitrógeno: extracto de levadura y glutamato sódico, y sales.

Con respecto a las fuentes de carbono se seleccionó la melaza porque representa una fuente económica y nutritiva para la promoción del crecimiento de microorganismos, además es fácil su obtención. Generalmente, esta fuente tiene un alto porcentaje de carbohidratos y sales, luego puede ser usada no sólo como fuente de cuerpos carbonados sino también de algunos micronutrientes y elementos traza que contribuyen a la multiplicación de la cepa. En cuanto al glicerol, éste también representa una fuente económica de nutrientes para el medio de cultivo. Ésta fuente se hizo realmente económica debido a las tendencias actuales de producción de biocombustibles, específicamente en la producción de biodiesel, que han dejado a este compuesto como uno de sus principales residuos. Éste compuesto tiene la propiedad de ser fácilmente

asimilable por las bacterias pertenecientes al grupo de los α -rizobios (Kuykendall *et al.*, 2005; Richardson *et al.*, 2004; Stowers, 1985). El nombre IUPAC de éste compuesto es 1,2,3-propanotriol y su fórmula estructural es $C_3H_8O_3$, generalmente es asimilado vía fosforilación e ingreso a la fase de obtención de energía de la glucólisis (Matheus *et al.*, 2002).

En lo que respecta a las fuentes de nitrógeno, se seleccionó el glutamato debido a su bajo costo y a que es metabolizable por las bacterias del género *Rhizobium* a excepción de *R. galegae* (Kuykendall *et al.*, 2005); éste compuesto representa una fuente importante a partir de la cual se pueden incorporar grupos amino y además actúa como intermediario en la síntesis de ácidos nucleicos y proteínas (Matheus *et al.*, 2003). Por otra parte, el extracto de levadura representa una importante fuente nutricional, no sólo porque actúa como fuente de compuestos nitrogenados sino también porque actúa como fuente de cofactores enzimáticos, vitaminas, aminoácidos y algunos minerales, luego su presencia en el medio alterno contribuye a suplir el déficit que pueden tener algunas bacterias en cuanto a la producción de éste tipo de compuestos, los cuales pueden resultar esenciales para el crecimiento. Según Madigan *et al.*, (2002) no todos los microorganismos tienen la misma capacidad biosintética, luego para el crecimiento de una cepa de *Escherichia coli* es suficiente un medio mínimo que contenga glucosa como fuente de carbono, mientras que para la multiplicación de *Leuostoc mesenteroides* es necesario un medio que además de las sales contenga glucosa, acetato, los 20 aminoácidos esenciales, purinas, pirimidinas y vitaminas -dentro del medio mínimo se incluyen los minerales traza-, por ejemplo. Así, la presencia de extracto de levadura como sustrato en el medio de cultivo alterno, puede llegar a suplir las necesidades específicas que pueden tener los microorganismos que se multipliquen allí.

Por último las sales, que actúan no sólo como fuente de micronutrientes sino también creando un efecto tampón sobre el medio de cultivo, lo cual contribuye a que no se den cambios fuertes en los valores de pH (Torrenegra, 2004).

5. Screening secundario y selección de factores

5.1 Screening secundario I – SSI-

No existió diferencia estadísticamente significativa entre los recuentos del -SP- con los obtenidos en -SSI- ($p>0.05$) por lo cual la eliminación de los sustratos que no resultaron significativos sobre la multiplicación de la cepa fue posible, y por consiguiente se descarta cualquier tipo de interacción influyente sobre la promoción del crecimiento celular. Sin embargo, estos datos son insuficientes para descartar otro tipo de relación, sumado a esto, el diseño estadístico utilizado en el -SP- fue de resolución III luego no permite establecer si existió interacción entre factores (Montgomery, 2005). Se realizó un Diseño Factorial Fraccionado -DFF- utilizando las mismas concentraciones de las fuentes que se usaron en el -SP- (Tab. 6, Tab. 14).

Tabla 14 Diseño factorial fraccionado y resultados con niveles factor.

Corrida	Factores codificados ²					Valor observado ¹	CVE ¹	Valor predicho ¹	CVP ¹
	C1	C3	N1	N2	S				
1	-1	+1	-1	-1	-1	2,50E+09	37,118%	-1,22E+10	32,035%
2	+1	-1	+1	-1	-1	2,79E+10	36,005%	4,29E+10	9,118%
3	+1	+1	-1	+1	-1	2,56E+09	58,816%	1,73E+10	22,662%
4	-1	+1	+1	-1	+1	1,20E+10	1,589%	2,68E+10	14,592%
5	+1	+1	+1	+1	+1	7,11E+10	2,989%	5,63E+10	6,950%
6	-1	-1	-1	+1	+1	3,27E+10	86,516%	4,77E+10	8,203%
7	+1	-1	-1	-1	+1	3,62E+10	79,224%	2,12E+10	18,446%
8	-1	-1	+1	+1	-1	8,44E+10	61,792%	6,94E+10	5,638%

¹Resultado de tres mediciones. ²En g/L las concentraciones ajustadas fueron: C1 nivel alto (+)= 5,67, nivel bajo (-)= 1,89; C3 nivel alto (+)= 4,44, nivel bajo (-)= 1,48; N1 nivel alto (+)= 0,43, nivel bajo (-)= 0,18; N2 nivel alto (+)= 0,47, nivel bajo (-)= 0,20; S nivel alto (+)= 0,50, nivel bajo (-)= 0,10.

Mediante la aplicación del análisis de regresión se generó la siguiente ecuación lineal (Ec. 8):

$$Y = 3,36842E+10 - 1,16533E+10 * C3 + 7,71667E+8 * C1 + 1,51742E+10 * N1 + 1,40092E+10 * N2 + 4,32833E+9 * S \quad (8)$$

Puesto que el valor del estadístico R-cuadrado es 0.594 se puede asegurar que el modelo explica casi un 60% la variabilidad de la concentración celular. Los resultados obtenidos muestran que el glutamato y el extracto de levadura presentan una influencia estadísticamente significativa ($p<0.05$) sobre el crecimiento de la cepa C50 de *Rhizobium* sp. cuando la fuente se aplica en el nivel superior (Tab. 15). Estos datos

contrastan con los previamente obtenidos donde ambas fuentes no habían resultado influyentes sobre la producción de biomasa. Esto se pudo deber, a que existió algún tipo de interacción entre los componentes del medio de cultivo, de tal manera que los sustratos que resultaban más influyentes sobre la multiplicación quizá no se encontraban disponibles o no fueron metabolizadas porque existían fuentes más fácilmente asimilables pero con menor contenido nutricional. En éste caso particular, es posible que la bacteria haya disminuido la actividad de las enzimas necesarias para el metabolismo de las otras fuentes de nitrógeno -extractos y glutamato- ya que en el medio de cultivo líquido había iones amonio provenientes de la sal nitrogenada usada, los cuales son asimilados con mayor facilidad. En general, el amonio es la fuente de nitrógeno preferida en bacterias Gram-negativas, para la asimilación de ésta, en primer lugar se da la incorporación a través de la membrana vía transporte activo o difusión simple y luego la incorporación a formas orgánicas, principalmente glutamato y glutamina (Pedrosa y Elmerich, 2007). Posiblemente se haya dado una situación similar con el extracto de levadura, no obstante, éste no sólo actúa como fuente de nitrógeno, sino también como fuente de cofactores enzimáticos (Takahashi *et al.*, 2006; Edens *et al.*, 2002). En el caso del screening secundario, el glutamato resultó tener una actividad significativa, lo cual se puede deber a que este no funciona únicamente como fuente de nitrógeno sino que tanto él como su esqueleto carbonado – α -cetoglutarato- también pueden actuar como fuentes de carbono o como intermediarios para el catabolismo o la síntesis de otras moléculas nitrogenadas como aminoácidos, purinas o pirimidinas (KEGG, 2008; Matheus *et al.*, 2003).

Tabla 15 Efectos y análisis de variables por método estadístico.

Fuente	GL	Efecto estimado	Suma de cuadrados	Radio – F	P
C1	1	1,54E+9	1,42E+19	0,02	0,8998
C3	1	-23,3E+9	3,26E+21	3,73	0,0713 ^b
N1	1	30,3E+9	5,52E+21	6,32	0,0230 ^a
N2	1	28,0E+9	4,71E+21	5,39	0,0338 ^a
S	1	8,65E+9	4,49E+20	0,51	0,8722

^aVariables que tuvieron un efecto significativo sobre la multiplicación de la cepa. Confianza 95%. ^bEfecto significativo. Confianza 92.5%.

En el caso de las fuentes de carbono estas nuevamente no resultaron significativas sobre el crecimiento de la cepa ($p > 0.05$). Sin embargo, los resultados muestran que la melaza también influye sobre el crecimiento de la cepa, y además éste factor resulta significativo cuando el error es 0.075 (Tab. 15). Generalmente, este tipo de residuos de la caña suelen tener alto contenido de hidratos de carbono los cuales representan una fuente de carbono importante para el crecimiento celular, casi 75%, de sales (Mn, Cu, Fe, Ca, K, Mg, Se) y además de vitaminas como la piridoxina que pueden ser empleadas como cofactores en la síntesis de otros biocompuestos de interés celular. Las principales vías para el metabolismo de carbohidratos en *Rhizobium* sp. son la Entner Doudoroff y la vía de las pentosas fosfato debido a que las enzimas fructosa-1,6 difosfato aldolasa y la 6-fosfofructoquinasa, fundamentales en la vía Embden-Meyerhof Parnas, tienen baja actividad (Kuykendall *et al.*, 2005). El glicerol resultó ser el sustrato con menor influencia sobre el crecimiento de la cepa C50 de *Rhizobium*. Las sales también presentaron baja influencia sobre el crecimiento de la cepa, sin embargo en el screening primario habían resultado ser las más influyentes, esto se pudo deber a alguna interacción entre éstas y los componentes que fueron excluidos en el –SP–.

5.2. Screening secundario II – SSII–.

Se modificaron las concentraciones de glutamato y de extracto de levadura, sin embargo, también se trabajó con la melaza ya que resultó ser la tercera fuente más importante en la multiplicación, la variación de las concentraciones fue hecha de acuerdo con el valor del efecto estimado (Tab. 15). A diferencia del paso de –SP– a –SSI– donde se removieron tres de las ocho fuentes presentes, en el paso de –SSI– a –SSII– se mantuvo constante el número de sustratos (Tab. 16). La concentración de sales y glicerol se mantuvo en el nivel inferior, debido a la significancia estadística que mostraron en –SSI– (Tab. 15), el criterio de decisión usado fue el costo económico.

Los niveles en g/L se ajustaron así: C3 nivel alto (+)= 2.96, nivel bajo (-)= 1.48; N1 nivel alto (+)= 0.66, nivel bajo (-)= 0.42; N2 nivel alto (+)= 0.73, nivel bajo (-)= 0.46.

Tabla 16 Diseño Factorial Fraccionado saturado de $\frac{1}{2}$ y un punto central, y resultados con niveles factor.

Corrida	Factores codificados ²			Valor observado ^{1,3}	CVE ³	Valor predicho ^{1,3}	CVP ^{1,3}
	C3	N1	N2				
1	-1	+1	-1	1,06E+11	20,362%	1,05E+11	11,607%

2	+1	+1	+1	1,99E+10	43,710%	1,90E+10	63,919%
3	0	0	0	4,22E+10	89,458%	4,58E+10	26,567%
4	+1	-1	-1	2,78E+10	54,343%	2,69E+10	45,292%
5	-1	-1	+1	3,34E+10	100,635%	3,25E+10	37,470%

¹Resultado de tres mediciones. ²En g/L: C1 = 1.89 y S= 0.10 se dejaron constantes.

Mediante la aplicación del análisis de regresión se generó la siguiente ecuación lineal (Ec. 9):

$$Y = 4,58267E+10 - 2,28833E+10 * C3 + 1,615E+10 * N1 - 2,00667E+10 * N2 \quad (9)$$

Puesto que el valor del estadístico R-cuadrado es 0,751 se puede asegurar que el modelo explica en un 75% la variabilidad de la concentración celular. Existió evidencia estadísticamente significativa que demuestra que los tres factores influyeron sobre el crecimiento de la cepa C50 ($p < 0.05$), la melaza y la levadura generaron un efecto negativo y el glutamato efecto positivo (Tab. 17).

Tabla 17 Efectos y análisis de variables por método estadístico.

Fuente	GL	Efecto estimado	Suma de cuadrados	Radio – F	P
C3	1	-4,57E+10	6,28E21	10,85	0.0093 ^a
N1	1	3,23E+10	3,12E21	5,40	0.0452 ^a
N2	1	-4,01E+10	4,83E21	8,34	0.0179 ^a

^aVariables que tuvieron efecto significativo sobre la multiplicación de la cepa. Confianza 95%.

La melaza continuó teniendo efecto negativo sobre el crecimiento celular, sin embargo, en esta ocasión su efecto fue estadísticamente significativo lo cual obliga a continuar disminuyendo la concentración de este factor y así provocar una mejor disposición de sustratos de tal manera que se favorezca la multiplicación de las células ($p < 0.05$). Sobre la levadura, se había hecho un incremento de la concentración de acuerdo con los resultados obtenidos en –SSI-, no obstante, este aumento mostró no ser positivo y por el contrario generó un efecto negativo sobre la bacteria, luego es necesario ajustar los niveles con el objeto de mejorar la respuesta ($p < 0.05$). Éste efecto negativo se pudo deber a que las altas concentraciones de extracto de levadura causan una alteración de la morfología celular en algunas cepas de rizobios, así que es posible que la

concentración alta dispuesta en el diseño experimental haya superado el límite de tolerancia de C50, lo cual provocó distorsión en las células, y por consiguiente una disminución en la viabilidad celular dentro del medio de cultivo, esto se puede afirmar, ya que estudios demuestran que existe una relación íntima entre estas variables (Skinner *et al.*, 1977). La concentración de glutamato siguió camino ascendente puesto que su efecto es significativo cuando la fuente se aplica en el nivel superior ($p < 0.05$).

6. Diseño de optimización de la respuesta: Box Behnken – BB-

De acuerdo con los resultados obtenidos en el –SSII- se variaron los niveles de los factores que resultaron significativamente influyentes. Este ajuste se realizó en el mismo sentido del efecto estimado de cada una de las variables (Tab. 18), así las concentraciones de melaza y levadura se ajustaron cerca del nivel inferior, mientras que la concentración de glutamato fue aumentada, lo que permitió hacer un acercamiento preliminar al rango de concentraciones que maximizan el efecto sobre la variable dependiente: concentración celular. De esta forma, las concentraciones de los sustratos variables fueron ajustadas, los valores se presentan en la misma tabla. El diseño Box Behnken es un diseño de superficie de respuesta –DSR-, este tipo de diseños son ampliamente usados para estudiar el efecto de varias variables y para buscar las condiciones óptimas de un sistema multivariable. La aplicación completa de un –DSR- para incrementar los productos de fermentación por optimización del medio de cultivo ha sido ampliamente reportado (Singh *et al.*, 2008; Deepak *et al.*, 2008; Senthikumar *et al.* 2008; Wang y Liu, 2008).

Tabla 18 Diseño de superficie de respuesta: Box Behnken y resultados con niveles factor.

Corrida ²	Factores codificados			Factores no codificados (g/L)			Valor promedio experimental ¹	CVE ¹	Valor promedio predicho ¹	CVP ¹
	C3	N1	N2	C3	N1	N2				
1	+1	+1	0	2.22	0.90	0.53	1,40E+10	44,627%	3,71E+10	31,712%
2	0	-1	+1	1.48	0.66	0.60	9,42E+09	30,281%	2,24E+10	52,407%
3	+1	0	-1	2.22	0.78	0.46	2,14E+10	58,677%	1,90E+10	61,780%
4	+1	0	+1	2.22	0.78	0.60	1,43E+10	27,223%	2,64E+10	44,546%
5	0	0	0	1.48	0.78	0.53	9,58E+10	14,826%	4,80E+10	24,500%
6	-1	0	-1	0.74	0.78	0.46	5,65E+10	27,864%	4,48E+10	26,253%

7	-1	+1	0	0.74	0.90	0.53	1,33E+11	70,766%	1,23E+11	9,550%
8	0	+1	-1	1.48	0.90	0.46	5,13E+10	25,378%	3,22E+10	36,466%
9	0	+1	+1	1.48	0.90	0.60	1,51E+11	24,200%	1,05E+11	11,227%
10	+1	-1	0	2.22	0.66	0.53	8,74E+10	58,228%	5,17E+10	22,721%
11	0	0	0	1.48	0.78	0.53	3,44E+10	47,502%	4,80E+10	24,500%
12	0	0	0	1.48	0.78	0.53	3,13E+10	26,562%	4,80E+10	24,500%
13	0	-1	-1	1.48	0.66	0.46	2,50E+10	66,562%	5,17E+10	22,721%
14	-1	0	+1	0.74	0.78	0.60	6,97E+10	3,286%	8,06E+10	14,588%
15	-1	-1	0	0.74	0.66	0.53	7,08E+10	24,920%	4,57E+10	23,511%

¹Resultado de tres mediciones. ²En g/L: C1 = 1.89 y S= 0.10 se dejaron constantes.

Mediante la aplicación del análisis de regresión se generó la siguiente ecuación cuadrática (Ec. 10):

$$\begin{aligned}
 Y = & 4,80222E+10 + 1,5675E+10*N1 + 1,07696E+10*N2 - \\
 & 1,99946E+10*C3 + 1,31956E+10*N1^2 + \\
 & 2,54192E+10*N1*N2 - 2,30142E+10*N1*C3 - \\
 & 8,49861E+9*N2^2 - 7,125E+9*N2*C3 + 3,16806E+9*C3^2
 \end{aligned}
 \tag{10}$$

Este modelo trabajó con 44 grados de libertad, 33 de estos son de error. Dado el valor del estadístico R-cuadrado, este modelo explica en 52% el comportamiento de la variable dependiente. Dos interacciones resultaron estadísticamente significativas sobre el crecimiento de la cepa: glutamato – extracto de levadura y glutamato – melaza, efecto positivo y negativo, respectivamente. Los factores glutamato y levadura considerados de manera independiente también tuvieron un efecto significativo, positivo y negativo, respectivamente. Los demás resultados se encuentran consignados en la tabla 19.

Tabla 19 Efectos y análisis de variables por método estadístico.

Factor	GL	Efecto estimado	Suma de cuadrados	Radio – F	P
C3	1	-3,99E+10	9,59E+21	8,40	0.0066 ^a
N1	1	3,13E+10	5,89E+21	5,16	0.0297 ^a
N2	1	2,15E+10	2,78E+21	2,44	0.1280
C3 X N1	1	-4,60E+10	6,35E+21	5.57	0.0244 ^a
N1 X N2	1	5,08E+10	7,75E+21	6.80	0.0136 ^a

C3 X N2	1	-1,42E+10	6,09E+20	0,53	0,4714
N1 X N1	1	2,63E+10	1,92E+21	1,69	0,2027
N2 X N2	1	-1,69E+10	8,00E+20	0,70	0,4086
C3 X C3	1	6,33E+9	1,11E+20	0,10	0,7570

^aVariables que tuvieron efecto estadísticamente significativo sobre la multiplicación de la cepa. Confianza 95%.

En presencia de melaza, los efectos estimados sobre la variable dependiente fueron siempre negativos, dos de esas combinaciones afectaron significativamente la multiplicación de la cepa. (Tab. 19). Como resultado de los diseños experimentales utilizados se obtuvo que la melaza ejerció una influencia negativa sobre la bacteria, luego las concentraciones altas de melaza no favorecen la multiplicación de la cepa, lo cual puede deberse a que quizá, ésta fuente provoca un aumento en la presión osmótica de las células, por la alta concentración de carbohidratos y de sales, desfavoreciendo la división celular. La exposición de un organismo a condiciones de alta presión osmótica se traduce en una disminución de la actividad de agua en el citoplasma; al parecer, tanto proteínas como otras macromoléculas biológicas han evolucionado para funcionar sólo dentro de determinados rangos de actividad de agua luego, algunas funciones celulares son afectadas (Vriezen *et al.*, 2007). Sin embargo, la concentración de esta fuente fue disminuida casi un 84% entre el SP y el BB luego su efecto negativo quizá no se deba únicamente al aumento en la osmolaridad del medio sino también a la presencia de residuos de agentes tóxicos como pesticidas, metales pesados, hidrocarburos, entre otros. La presencia de pesticidas o metales pesados suele afectar el crecimiento de las bacterias ya que provocan la interrupción de algunos procesos de señalización celular o afectan la actividad de las enzimas por sustitución de los cofactores metálicos, además también pueden llegar a ser interferentes dentro de los procesos de nodulación por las mismas razones (Atlas y Bartha, 2002; Delorme *et al.*, 2003). Fox *et al.*, (2007) reportó que la presencia de pesticidas puede afectar la actividad de la enzima nitrogenasa hasta en un 90%.

El glutamato resultó ejercer un efecto significativamente positivo sobre el crecimiento de la cepa, al igual que su interacción con el extracto de levadura ($p < 0.05$). Por tanto, es posible que los cofactores presentes en el extracto de levadura estimulen el

metabolismo de éste aminoácido. Además como se mencionó anteriormente, este tipo de compuesto es intermediario en el metabolismo presentándose tanto a nivel de reacciones catabólicas como anabólicas, y participando tanto en procesos de obtención de energía como en la síntesis de biomoléculas esenciales para la reproducción y el mantenimiento celular (KEGG, 2008). Por otra parte, es un compuesto anaplerótico pudiendo proporcionar intermediarios ausentes o que estén en bajo nivel en el Ciclo de Krebs, esto mediante la conversión de glutamato a α -cetoglutarato vía glutamato deshidrogenasa la cual requiere la presencia de NADH + H⁺ -Nicotinamida adenina dinucleótido- como cofactor enzimático (Matheus *et al.*, 2002). Por otra parte, el glutamato está reportado por su actividad como soluto compatible (Vriezen *et al.*, 2007; Bostford y Lewis, 1990), y podría participar en el proceso de osmorregulación de la célula favoreciendo así su desarrollo bajo estrés osmótico, lo cual estaría relacionado con la primera hipótesis enunciada con relación al efecto negativo de la melaza.

El extracto de levadura funciona como fuente de diferentes elementos nutricionales – carbono, nitrógeno, fósforo, azufre, elementos traza-. Sin embargo, también se destaca porque puede actuar como fuente de cofactores enzimáticos (Takahashi *et al.*, 2006; Edens *et al.*, 2002). Esto tiene importancia ya que muchas de las cepas de *Rhizobium* sp. requieren algunos factores de crecimiento como biotina, ácido pantoténico y ácido nicotínico para su crecimiento (Kuykendall *et al.*, 2005).

En las figuras 6-8 se muestran las superficies de respuesta obtenidas a partir del diseño utilizado. Las representaciones gráficas se muestran pareadas ya que la variable respuesta es una función de tres variables y no se pueden representar en el espacio tridimensional. Por ello, se debe hacer un factor cero, provocando así la generación de una función de dos variables dependientes y una respuesta (Thomas, 2005).

Se observa que la respuesta de la variable dependiente se ve incrementada cuando el extracto de levadura y el glutamato se encuentran en el nivel superior, lo que confirma el efecto significativo de ésta interacción (Fig. 6). El efecto que produce la interacción entre melaza y glutamato muestra su máximo valor cuando se encuentran en el nivel bajo y el alto, respectivamente. Cuando los dos factores se encuentran en el nivel superior se observa una disminución del efecto (Fig. 7). Finalmente, la melaza y el extracto muestran un efecto positivo cuando ambos se encuentran en el nivel inferior y

superior, respectivamente (Fig. 8). Luego la concentración que optimiza la respuesta de forma presuntiva es: tanto glutamato como extracto de levadura en el nivel superior y melaza en el inferior.

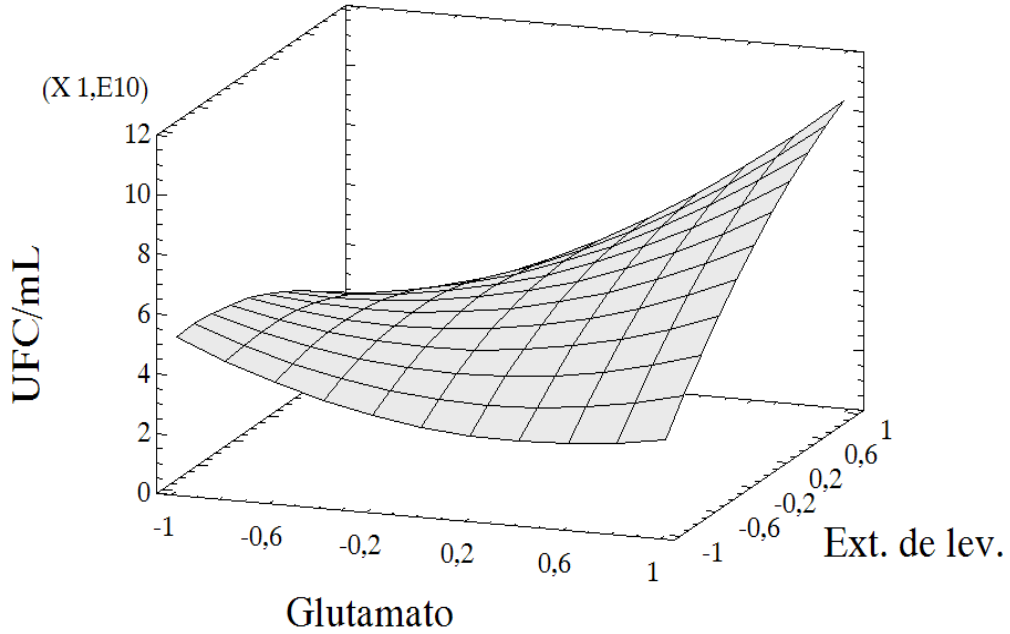


Figura 6 Gráfico de superficie de respuesta entre las variables glutamato y extracto de levadura. El máximo efecto se da cuando la concentración de glutamato y extracto de levadura están en el nivel superior. Confianza 95%.

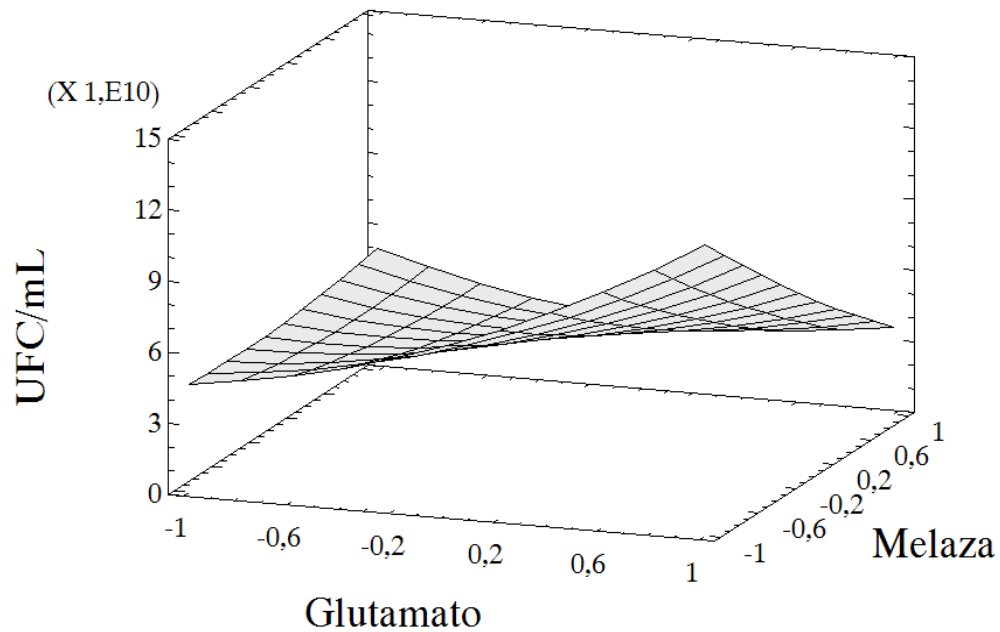


Figura 7 Gráfico de superficie de respuesta entre las variables melaza y glutamato. El máximo efecto se da cuando la concentración de extracto de levadura está en el nivel superior y la de melaza en el inferior. Confianza 95%.

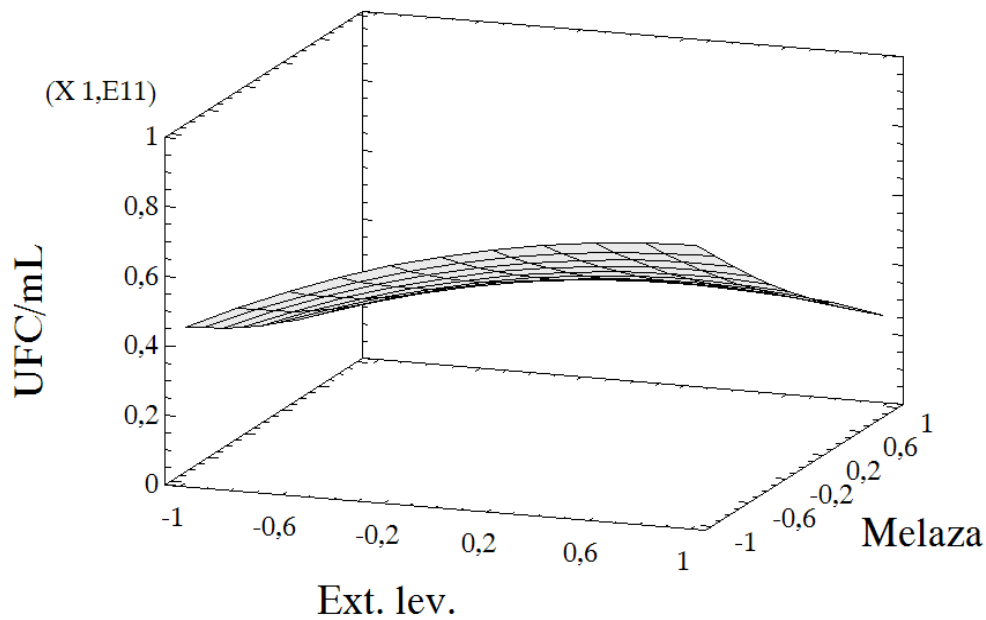


Figura 8 Gráfico de superficie de respuesta entre las variables extracto de levadura y melaza. El máximo efecto se da cuando la concentración de glutamato está en el nivel superior y la de melaza en el inferior. Confianza 95%.

De acuerdo con la herramienta de optimización del software estadístico Statgraphics Plus 5.1 las concentraciones que maximizan el efecto sobre el crecimiento celular fueron calculadas (tabla 20).

Tabla 20 Medio de cultivo complejo propuesto: -DR-.

Fuente	Dato codificado	Concentración (g/L)
Carbono	C1	1.89
	C3	----*
Nitrógeno	N1	----*
	N2	----*
Sales	S	0.10

* Debido a restricciones de derechos de autor las concentraciones no se reportan.

7. Comparación de la cinética de crecimiento en los medios de cultivo tradicional y alterno

Se realizó de manera simultánea la cinética de crecimiento para la cepa C50 de *Rhizobium* sp. en el medio -LM- y en el alterno -DR-. En el medio tradicional, la

velocidad específica fue mayor que en el medio alterno (Fig. 9-11; Tab. 21), así el fin de la fase exponencial fue a las 17 horas y a las 25 horas, respectivamente. Esto indica que el metabolismo de los sustratos en el medio alterno –DR- requiere de una mayor diversidad enzimática lo que repercute en un coste energético más alto y en consecuencia un tiempo de adaptación más extenso y una velocidad de crecimiento menor. Además, la presencia de sustratos complejos y de dos fuentes de carbono (entre ellas una compleja) provocaron una diauxia entre la hora 15 y 17 de crecimiento, luego es posible que el microorganismo haya iniciado su crecimiento a expensas de la fuente de carbono más fácilmente metabolizable y luego haya procedido con el metabolismo de cualquier otra fuente presente en el medio. Una diauxia se conoce como el metabolismo de dos sustratos, es frecuentemente observada cuando dos o más fuentes de carbono son usadas en el mismo medio (Tsuji *et al.*, 1997). El tiempo que tarda la diauxia generalmente se debe a la preparación de la maquinaria enzimática necesaria para el metabolismo del nuevo o de los nuevos sustratos. Sin embargo, éste evento no se observó únicamente en la fase exponencial de crecimiento. Entre la hora 39 y la 63 se observaron una serie de diauxias que de manera directa reflejan la presencia de un sustrato complejo. En consecuencia, es posible que el metabolismo durante el final de la fase exponencial y la fase estacionaria hasta la hora 72 (tiempo muestreado) haya sido sostenido por la melaza, esto por la alta variedad de carbohidratos que posee. Así, desde el final de la fase exponencial hasta la segunda diauxia el crecimiento celular pudo estar soportado por la fuente de carbono más abundante y fácilmente metabolizable de la melaza ya que hubo un comportamiento constante desde la hora 25 hasta la 36. Entre la hora 36 y 39 se observó una disminución drástica de la concentración celular lo que podría ser reflejo de un agotamiento de la fuente de carbono metabolizada hasta la hora 36 y una preparación enzimática para el metabolismo de otro sustrato, posiblemente otro de fácil degradación. No obstante, la concentración de éste no debió ser alta ya que sólo sostuvo el crecimiento durante tres horas: entre las horas 39 y 42, pero posterior a eso cayó nuevamente la concentración celular entre las horas 42 y 45. Entre la hora 45 y 54 se dan dos nuevas caídas y dos nuevos ascensos de magnitud similar en la concentración celular lo que podría reflejar el metabolismo de otras dos fuentes de carbono que quizá también se encontraban en baja concentración ya que sólo pudieron proporcionar a la cepa energía para un periodo

corto de tiempo. A partir de la hora 54 y hasta la hora 60 se da un periodo de equilibrio que refleja que la tasa de muerte y de generación de nuevas células fue igual, es posible que durante este periodo de tiempo se estuviera adecuando el metabolismo para la asimilación de un nuevo sustrato ya que entre la hora 60 y 63 la concentración aumenta de manera pronunciada, después de la hora 63 se observa un periodo donde no hay cambios bruscos en la concentración celular. Todas estas fluctuaciones en la concentración celular durante la fase estacionaria demuestran la presencia de un sustrato complejo tal como es la melaza, la cual obliga a la bacteria a expresar un mayor número de proteínas catalíticas las cuales permiten metabolizar un mayor número de fuentes de crecimiento. Esto confirma lo dicho por Oliver *et al.* (1999) quienes aseguran que uno de los inconvenientes que se generan del uso de medios de fermentación complejos es la presencia de una serie de diferentes formas de compuestos dentro del mismo macronutriente dando lugar a patrones de crecimiento diauxicos. Entre el punto de mayor y menor concentración celular existió un 21% de variación lo que sí se traduce en términos de recuento en UFC/mL no implicaría una disminución importante de la concentración celular ya que el recuento no disminuiría ninguna unidad logarítmica.

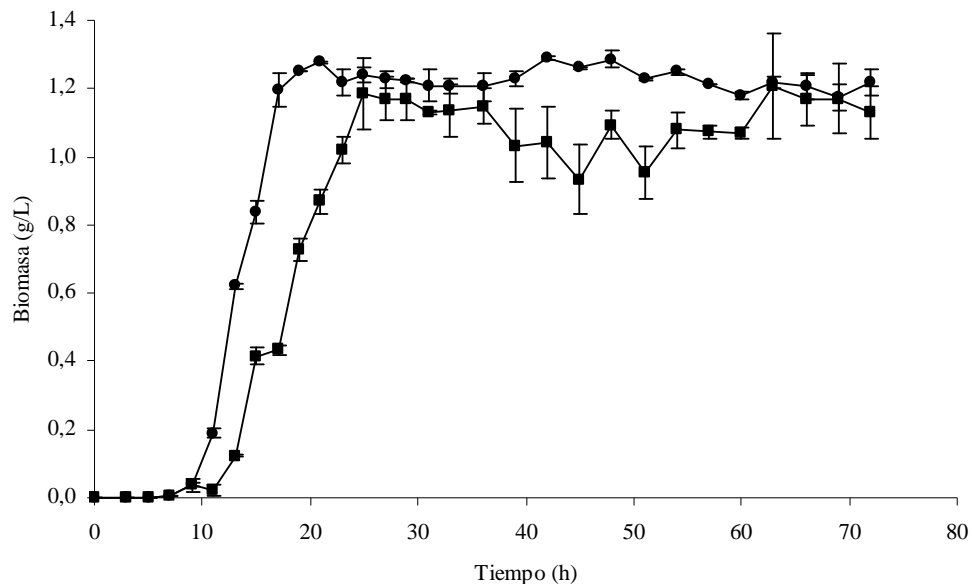


Figura 9 Cinética de crecimiento de la cepa C50 de *Rhizobium* sp. en medio -LM- (●) y en -DR- (■). La cuantificación se realizó por turbidimetría ($\lambda=540\text{nm}$).

Se hizo recuento de la cepa C50 en UFC/mL a la hora 30 de crecimiento, lo que aseguraba que el microorganismo se encontraba en fase estacionaria en ambos medios de cultivo. El ensayo mostró que no hubo diferencias estadísticamente significativas ($p > 0.05$) entre ambos recuentos: sobre el medio -LM- y sobre el medio-DR-, lo que demuestra que el aumento en la turbidez del medio fue causada por el incremento de la concentración celular. En ocasiones, la presencia de compuestos como los exopolisacáridos, típicos en *Rhizobium* sp., pueden provocar un aumento en la absorbancia del medio sin implicar necesariamente un aumento significativo de la concentración celular en éste (Comunicación personal, Baldani, 2008).

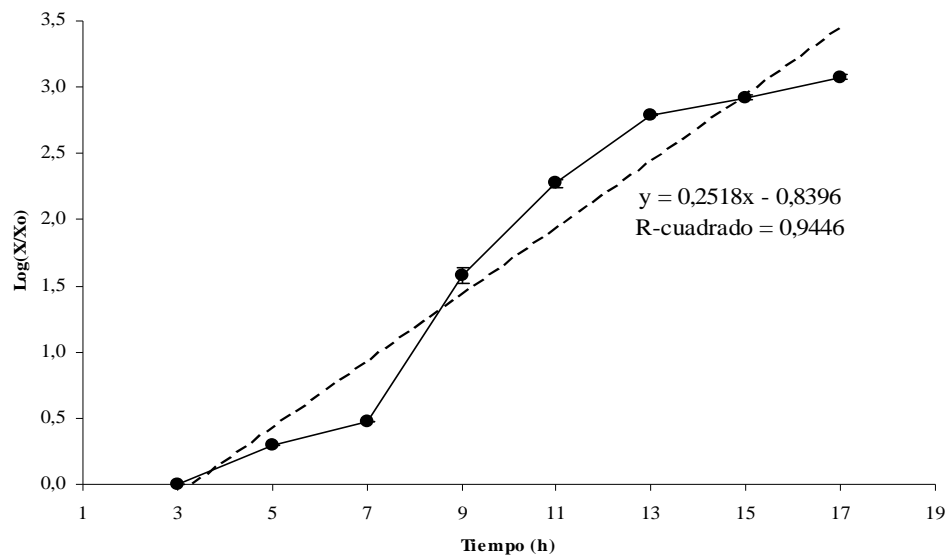


Figura 10 Linealización de la fase exponencial en el medio -LM-. La ecuación presentó un coeficiente de determinación mayor a $0.945 > 0.9$, luego cumple con cinética de orden uno. Se tomó desde la hora 3 hasta la 17 para el cálculo.

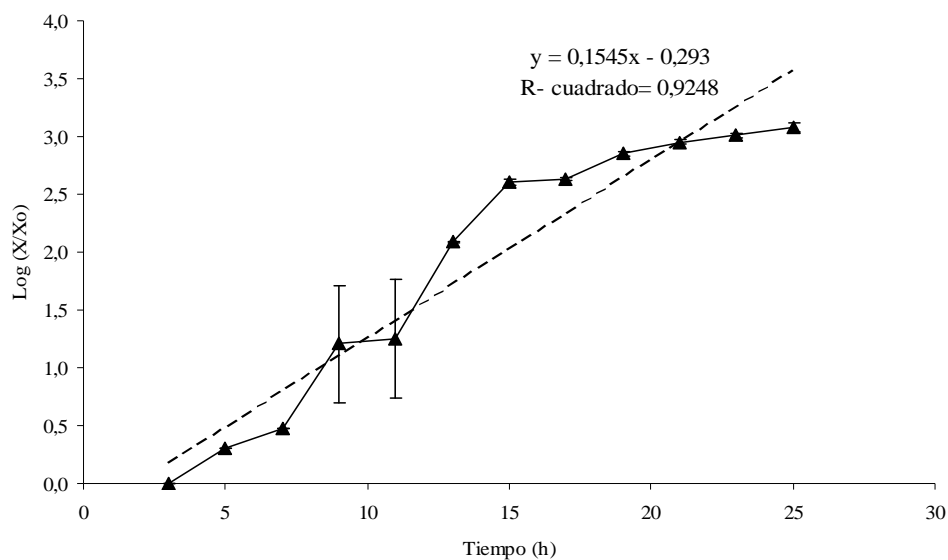


Figura 11 Linealización de la fase exponencial en el medio -DR-. La ecuación presentó un coeficiente de determinación mayor a $0.925 > 0.9$, luego cumple con cinética de orden uno. Se tomó desde la hora 3 hasta la 25 para el cálculo.

La velocidad específica y el tiempo de duplicación de C50 en el medio -LM- variaron con respecto a la curva preliminar (Tab. 10, Tab. 21), esto se pudo deber a un cambio en las condiciones ambientales, lo cual modificaría la actividad metabólica de la cepa, ya sea el ajuste de temperatura o de agitación del equipo variaron por su uso continuado. El tiempo de duplicación en el medio -LM- fue 41% menor que en el medio alterno lo que representa una forma indirecta de evidenciar la complejidad bioquímica del medio de -DR-. Como se mencionó anteriormente, un mayor número de enzimas debieron ser expresadas para llevar a cabo el metabolismo de las fuente de carbono y energía de éste medio, lo que conlleva una mayor inversión energética luego la bacteria crece a menor velocidad porque parte de la energía obtenida debe ser dedicada a la expresión de enzimas catabólicas y de transporte, mientras que en un medio definido la energía puede dedicarse de manera más exclusiva a procesos de

Tabla 21 Parámetros cinéticos en ambos medio de cultivo.

Parámetro	Valor	
	-LM-	-DR-
Tiempo de duplicación	2,676 h	4,472 h
Velocidad específica de crecimiento	0,259 h ⁻¹	0,155 h ⁻¹

división celular (Madigan *et al.*, 2002; Matheus *et al.*, 2002).

Con respecto a la fase exponencial del medio –DR-, el cálculo de los parámetros cinéticos se realizó sobre toda la fase, sin embargo no se tuvo en cuenta la diauxia. Si ésta se tiene en cuenta es necesario el cálculo de dos velocidades específicas y dos tiempos de duplicación, antes y después de éste evento (Fig. 12-13 y Tab. 22).

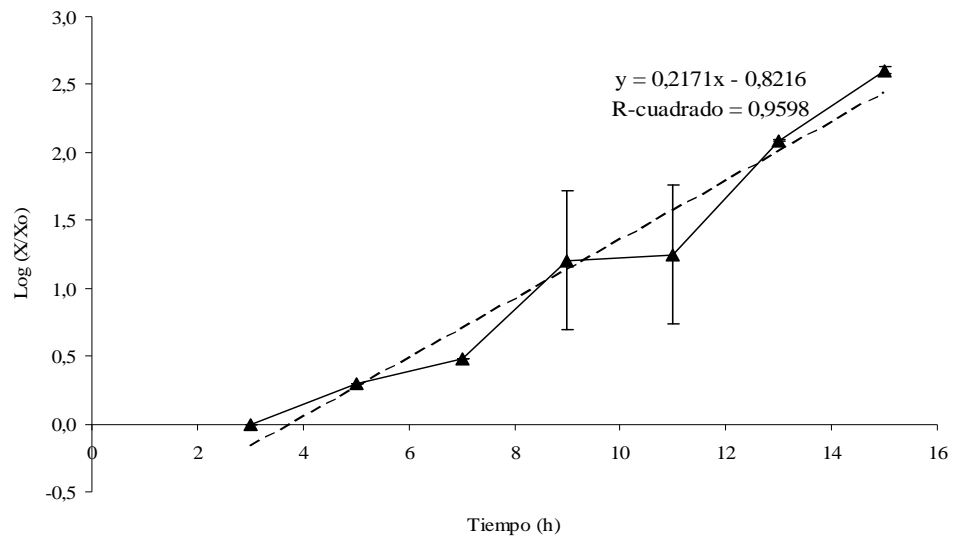


Figura 12 Linealización de la primera parte de la fase exponencial en medio –DR-. La ecuación presentó un coeficiente de determinación mayor a $0,959 > 0,9$, luego cumple con cinética de orden uno. Se tomó desde la hora 3 hasta la 15 para el cálculo.

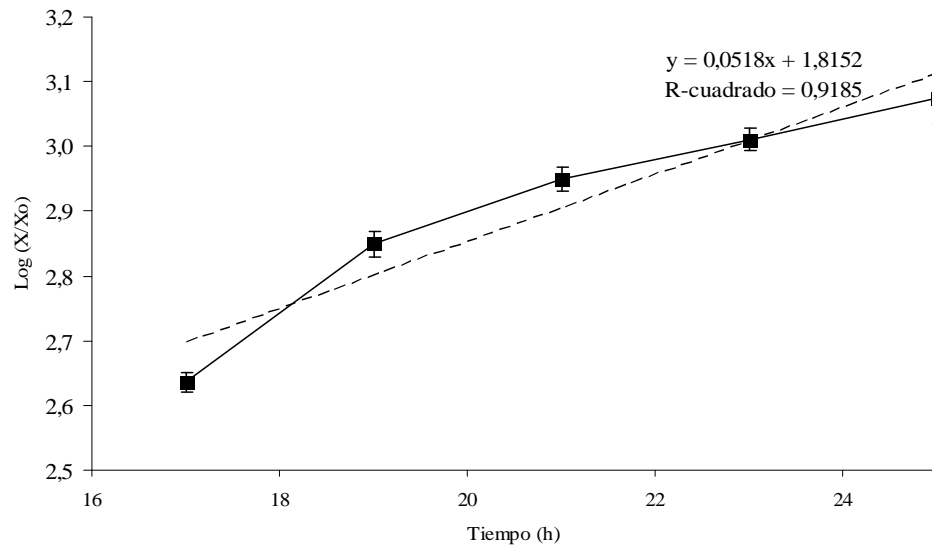


Figura 13 Linealización de la segunda parte de la fase exponencial en medio –DR-. La ecuación presentó

un coeficiente de determinación mayor a 0.919>0.9, luego cumple con cinética de orden uno. Se tomó desde la hora 17 hasta la 25 para el cálculo.

Tabla 22 Parámetros cinéticos: Medio –DR-.

Parámetro	Valor	
	-DR-1*	-DR-2*
Tiempo de duplicación	3,193 h	13,381 h
Velocidad específica de crecimiento	0,217 h ⁻¹	0,0518 h ⁻¹

*-DR-1: Primera parte de la fase exponencial; -DR-2: Segunda parte de la fase exponencial.

Así la primera fase parte de la fase exponencial de crecimiento presenta una velocidad específica de crecimiento casi cuatro veces más rápida, luego se podría deducir que el primer sustrato que se metaboliza debe implicar un bajo coste energético siendo de fácil degradación. Generalmente, las melazas suelen contener una gran diversidad de carbohidratos lo que implicaría la síntesis de varias enzimas para el metabolismo de ellas. La otra fuente de carbono presente es el glicerol, el cual ingresa y se metaboliza fácilmente dentro de la célula, además representa una fuente importante de energía ya que entra a la vía Entner-Doudoroff en la fase de obtención de energía y luego de ser convertido a acetil-CoA es ingresado al Ciclo de Krebs, así la ganancia promedio de ATPs en condiciones ideales es de 19 ATP por cada molécula de glicerol metabolizada (Matheus *et al.*, 2002). Por tanto, es posible que el primer sustrato metabolizado haya sido el glicerol y más tarde la melaza o el esqueleto carbonado del glutamato.

8. Pruebas de estabilidad acelerada –preliminar- en turba

Tanto en el medio alterno –DR- como en el –LM- no hubo una diferencia estadísticamente significativa entre los recuentos: el inicial, a los 15 y a los 30 días posteriores a la refrigeración ($p < 0.05$). En éste primero, la pérdida de viabilidad a los 30 días fue cercana al 50% y en el medio –LM- fue de casi 60% lo cual significa que los recuentos no disminuyeron ninguna unidad logarítmica. Según la prueba de comparación de muestras múltiples de Tukey con 95% de confianza, no existe diferencia estadísticamente significativa entre la pérdida de viabilidad en el medio alterno y el tradicional. Esto se pudo deber a que el medio –DR- presenta una alta variedad de nutrientes (Khavazi *et al.*, 2007), en especial fuentes de carbono debido a la

presencia de melaza y extracto de levadura- lo que hace que el metabolismo bacteriano se ralentice debido a que el microorganismo debe sintetizar una mayor cantidad de enzimas para mantener su metabolismo (Matheus, 2002; Edens *et al.*, 2002), sumado a esto la baja temperatura provoca un frenado parcial de la actividad celular (Matheus *et al.*, 2002), luego el efecto conjunto puede provocar el mantenimiento de la cepa en el soporte por un periodo prolongado de tiempo. Por otra parte, la presencia de glutamato el cual puede actuar como soluto compatible y que se acumula intracelularmente en condiciones de estrés salino pudo permitir a la célula protegerse mejor de las condiciones adversas que se pudieran generar en el soporte (Hazran, 1999); sin embargo, estudios demuestran que ésta actividad se hace más importante cuando el soporte se encuentra en bajas concentraciones de humedad (<10%) donde los mecanismos de tolerancia a la desecación son activados (Vriezen *et al.*, 1999; Zahran, 1999).

En consecuencia, según los resultados obtenidos en el ensayo se puede afirmar de manera presuntiva que el medio -DR- puede ser usado como medio de cultivo para la multiplicación de rizobios y además como es estable sobre el soporte -turba-, ya que no hay una pérdida significativa de viabilidad dentro del primer mes de almacenamiento, el medio -DR- puede representar una alternativa eficaz para la disminución de los costos en la producción de un bioinoculante con base en esta cepa de rizobio (Fig. 14).

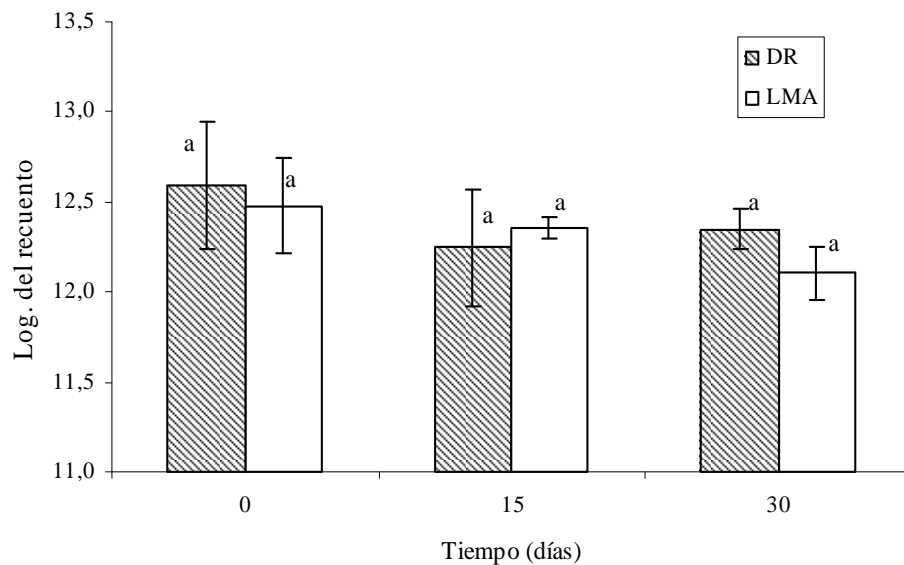


Figura 14. Estabilidad de los microorganismos en el soporte con el medio de cultivo tradicional y el alterno. En blanco el medio –LM- y en negro el –DR-; con 95% de confianza no hay diferencia estadísticamente significativa entre los recuentos ni de los diferentes tratamientos ni de los diferentes tiempos.

9. Evaluación del medio alterno sobre el crecimiento de otras cepas de rizobios

No hubo diferencias estadísticamente significativas ($p > 0.05$) sobre el valor de la concentración celular (UFC/mL) en la cepa T14 de *Rhizobium* sp. que nodula trébol ni en la cepa J01 de *Bradyrhizobium* sp. que nodula soya, crecidas en el medio tradicional y en el alterno (Fig. 15). Lo que demuestra de manera preliminar, que el medio es apto para el crecimiento de otras cepas de rizobios. En general, las cepas de *Rhizobium* sp. tienen una alta variedad enzimática lo que les permite metabolizar un amplio rango de sustratos (Stowers, 1985; Kuykendall *et al.*, 2005), esto corrobora los datos obtenidos con la cepa T14 la cual presentó recuentos levemente mayores sobre el medio –DR- que sobre el –LM- (Fig. 15). Por otra parte, las cepas del género *Bradyrhizobium* sp. presentan una menor variedad metabólica, luego no son capaces de degradar compuestos como disacáridos, trisacáridos o algunos monómeros de carbohidratos (Stowers, 1985; Kuykendall, 2005), de esta forma su multiplicación requiere la adición de fuentes de carbono más específicas. Sin embargo, la cepa J01 presentó recuentos celulares similares en los dos medios de cultivo, lo cual demuestra que las fuentes de crecimiento presentes en el medio –DR- son aptas para el crecimiento de ésta cepa. Es posible, que gran parte de su crecimiento se haya mantenido por la presencia de glicerol, ya que como se aseguró antes, es una fuente de fácil asimilación para los rizobios (Stowers, 1985; Arias y Martínez, 1976). También es posible que existieran carbohidratos en la melaza que fueran metabolizables por ésta cepa y en consecuencia, sostuvieran su crecimiento.

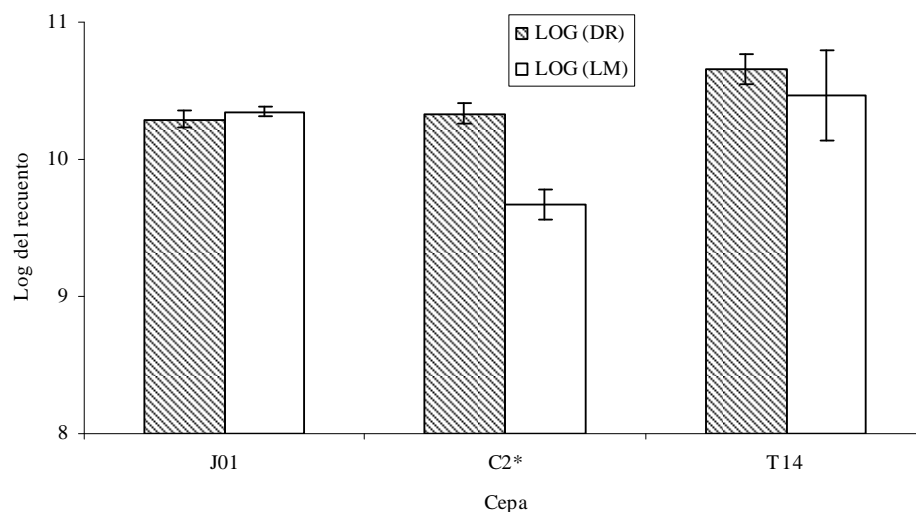


Figura 15. Crecimiento de las cepas J01, C2 y T14 sobre el medio alterno y el tradicional. Cada recuento es el equivalente de tres mediciones.*Diferencia estadísticamente significativa.

Por otra parte, existió una diferencia estadísticamente significativa ($p < 0.05$) entre los recuentos de la cepa C2 en el medio –LM- y en el –DR- (Fig. 15), favoreciendo así el crecimiento de ésta sobre el medio alterno. La concentración fue aproximadamente cuatro veces mayor en el medio –DR- lo cual es de gran importancia para el desarrollo del proyecto financiador, ya que el arreglo silvopastoril que se definió dentro de éste incluye plantas de *Leucaena leucocephala* y *Clitoria ternatea*, noduladas por las cepas C50 y C2, respectivamente. Luego para la producción de un bioinoculante basado en estas cepas de rizobios, se puede decir de manera presuntiva que el medio –DR- sirve para llevar a cabo el crecimiento de ambas, con lo cual se puede llegar a disminuir los costos de producción del biofertilizante rizobiano.

10. Análisis de costos

En las tablas 23 y 24 se encuentran consignadas las relaciones de costos tanto en el medio tradicional como en el alterno.

Tabla 23 Matriz de costos del medio –LM–.

Sustrato	Cantidad de aplicación (g/l)	Valor reactivo	Cantidad	Unidad	Total
Manitol	10,00	\$125.000	500	Gramo	\$ 2.500,00
Extracto de levadura	0,50	\$150.000	500	Gramo	\$ 150,00
Fosfato dibasico de potasio	0,50	\$100.000	500	Gramo	\$ 100,00
Sulfato de magnesio	0,20	\$62.000	500	Gramo	\$ 24,80
Cloruro de sodio	0,10	\$90.000	1000	Gramo	\$ 9,00
Total:					\$2784,30

Tabla 24 Matriz de costos del medio alternativo

Sustrato	Cantidad de aplicación (g/l)	Valor reactivo	Cantidad	Unidad	Total
Melaza	----*	----*	1000	Gramo	\$ 0,13
Glicerol	1.89	4.000	500	Gramo	\$ 15,12
Extracto de levadura	----*	----*	500	Gramo	\$ 21,60
Glutamato	----*	----*	500	Gramo	\$ 4,80
Sales	0,10	267.600	1000	Gramo	\$ 26,76
Total:					\$68,41

* Debido a restricciones de derechos de autor las concentraciones no se reportan.

Luego la reducción de costos es de casi el 98% entre la utilización del medio tradicional y el medio alternativo lo que contribuye a una disminución importante en los gastos de producción de un biofertilizante basado en ésta cepa de rizobio, lo que de igual manera recae en una disminución del precio del producto y por consiguiente en una reducción de costos en la fertilización nitrogenada, trayendo consigo un aumento en el nivel de vida de los pequeños y medianos productores.

Conclusiones

La estrategia de usar diseños estadísticos de manera subsecuente permitió estandarizar un medio de cultivo complejo para la multiplicación de la cepa C50 de *Rhizobium* sp. Criterios de costo económico y disponibilidad en el mercado permitieron la selección de cinco fuentes de crecimiento de las cuales tres mostraron influir de forma estadísticamente significativa sobre el crecimiento de la cepa. Posteriormente, el análisis estadístico basado en el diseño Box-Behnken permitió hallar las concentraciones que maximizaban la respuesta, en g/L: glicerol 1.89, melaza 0.67, glutamato 0.90, extracto de levadura 0.60 y sales 0.10.

El medio –DR- tardó 8 horas más que el –LM- para lograr el máximo valor de biomasa, lo que pudo repercutir en los costos de fermentación, sin embargo la disminución en los costos de producción del medio fue cercana al 98%, además no hubo diferencia estadísticamente significativa entre los recuentos del medio –LM- y el –DR-. Por otra parte, el medio fue apto para el crecimiento de cepas de rizobios de crecimiento lento, intermedio y rápido, las cuales difieren en su metabolismo. Finalmente, el medio mantuvo la población celular sobre turba en el primer mes de evaluación, luego el medio representa de manera preliminar una opción para disminuir los costos de producción de un inoculante basado en ésta cepa.

Recomendaciones

Llevar a cabo la caracterización química de la melaza, cuando esta sea cambiada, antes de ser usada para la elaboración del medio de cultivo.

Verificar la estabilidad de la bacteria en tiempo real sobre el soporte.

Verificar la efectividad del medio sobre más cepas de rizobios.

Estandarizar el medio –DR- sólido para la realización de los controles de calidad.

Verificar la estabilidad genotípica del banco de cepas.

Verificar que la composición del medio no afecte el proceso de nodulación.

Bibliografía

Arias, A., Martínez, D. 1976. Glycerol metabolism in *Rhizobium*. Canadian Journal of Microbiology. 22(2):150-3.

Atlas, R., Barta, R. 2002. *Ecología Microbiana y Microbiología Ambiental*. Segunda Edición. Prentice Hall. Madrid, España. 676 p.

Baldani, V.L. 2008. EMBRAPA Agrobiología. *Comunicación personal*.

Bissonnette, N., Lalande, R., Bordeleau, L.M.1986. Large-scale production of *Rhizobium meliloti* on whey. Applied and Environmental Microbiology 52:838–841.

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.

Botsford, J., Lewis, T. 1990. Osmoregulation in *Rhizobium meliloti*: production of glutamic acid in response to osmotic stress. Appl. Environ. Microbiol. 56:488–494.

Box, Behnken

Box, G., Behnken, D. 1960. Some new three level designs for the study of quantitative variables. Technometrics. 2: 455-475.

Bozoglu, T., Ozilgen, M., Bakir, U. 1987. Survival kinetics of lactic acid starter cultures during and after freeze drying. Enzyme Microbiology Technology. 9: 531–537.

Brockwell, J., P. J. Bottomley, and J. E. Thies. 1995. Manipulation of rhizobia microflora for improving legume productivity and soil fertility: a critical assessment. Plant and Soil. 174:143–180.

Buergler, A., Fike, J., Burger, J. Feldhake, C., McKenna, J., Teutsch, C. 2005. Botanical Composition and Forage Production in an Emulated Silvopasture. Agronomy Journal. 97: 1141-1147.

Burris, R. 1991. Nitrogenases. The Journal of Biological Chemistry. 266(15): 9339-9342

- Cleland, D., Krader, P., McCree, C., Tang, J., Emerson, D. 2004.** Glycine betaine as a cryoprotectant for prokaryotes. *Journal of Microbiological Methods* 58: 31– 38
- Cook, B., Pengelly, B., Brown, S., Donnelly, J., Eagles, D. Franco, A. Hanson, J., Mullen, B., Partridge, I., Peters, M., Schultze, R. 2005.** Tropical Forages: an interactive selection tool., [CD-ROM], CSIRO, DPI&F(Qld), CIAT and ILRI, Brisbane, Australia.
- 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., 2005. ISBN 958-8210-79-8.
- Deepak, V., Kalishwaralal, K., Ramkumarpandian, S., Venkatesh Babu, S., Senthikumar, S.R., Sangiliyandi, G. 2008.** Optimization of media composition for Nattokinase production by *Bacillus subtilis* using response surface methodology. *Bioresour. Technol.* 99, 8170–8174.
- Delorme, T., Gagliardi, J., Angle, J., Berkum, P., Chaney, R. 2003.** Phenotypic and Genetic Diversity of Rhizobia Isolated from Nodules of Clover Grown in a Zinc and Cadmium Contaminated Soil. *Journal of Soil Science Society American.* 67: 1746-1754.
- Díaz, A. 2008.** Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria. Centro de Biotecnología y Bioindustria. Laboratorio de Control Biológico. *Comunicación personal.*
- Doyle, M., Beuchat, L., Montville, T. 2001.** Microbiología de los Alimentos. Fundamentos y Fronteras. Ed. Acribia. Zaragoza. España.
- Edens, N. Reaves, L., Bergana, L., Reyzer, I., O'Mara, P. Baxter, J., Snowden, K. 2002.** Yeast Extract Stimulates Glucose Metabolism and Inhibits Lipolysis in Rat Adipocytes in Vitro. *Biochemical and Molecular Actions of Nutrients.* 132: 1141-1148.
- FEDEGAN.** Federacion Colombiana de Ganaderos. www.fedegan.org.co.
- Ferreira, S., Bruns, R., Ferreira, H., Matos, G., David, J., Brandao, G., da Silva, E., Portugal, L., dos Reis, P., Souza, A. dos Santos, W. 2007.** Box-Behnken design: An alternative for the optimization of analytical methods. *Analytica Chimica Acta.* 597: 179–186.

- Fox, J., Gullede, J., Engelhaupt, E., Burow, M., McLachlan, J.** 2007. Pesticides reduce symbiotic efficiency of nitrogen-fixing rhizobia and host plants. PNAS: Proceedings of the National Academy of Sciences. 104(24): 10282-10287.
- Franco, A. y Dobereiner, J.** 1994. A biología do solo e sustentabilidade dos solos tropicais. Summa Phytopathologica. 20: 68 -74.
- Gage, D.** 2004, Infection and Invasión of Roots by Symbiotic, Nitrogen-Fixing Rhizobia during Nodulation of Temperate Legumes. Microbiology and Molecular Biology Reviews. 68(2):280-300.
- Gamarra, J.** 2005. La economía del Cesar después del algodón. Colombia: Banco de la República, CEER, 2005. ISSN 1692-3715.
- Garrido, M.F.** 2008. Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria. Centro de Biotecnología y Bioindustria. Laboratorio de Microbiología de Suelos. *Comunicación personal*. mgarrido@corpoica.org.co.
- Hubálek, Z.** 2003. Protectants used in the cryopreservation of microorganisms. Cryobiology. 46: 205–229.
- Ibrahim, M., Franco, M., Pezo, D., Camero, A., Araya, L.** 2001. Promoting intake of *Cratylia argentea* as a dry season supplement for cattle grazing *Hyparrhenia rufa* in the subhumid tropics. Agroforestry Systems. 51: 167-175
- Jain, S.K., Pathak, D.V., Sharma, H.R.** 2000. Alternate carbon substrate for mass production of *Rhizobium* inoculants. Haryana Agricultural University Journal of Research 30:1-6.
- Jian-Zhong, L., Li-Ping, W., Qian-Ling, Z., Hong Xu., Liang-Nian, J.** 2003. Optimization of glucose oxidase production by *Aspergillus niger* in a benchtop bioreactor using response surface methodology. World Journal of Microbiology and Biotechnology. 19: 317–323.
- Juma, H., Abdulrazak, S., Muyinga, R., Ambula, M.** 2006. Evaluation of *Clitoria*, *Gliricidia* and *Mucuna* as nitrogen supplements to *Napier* grass basal diet in relation to the performance of lactating Jersey cows. Livestock Science. 103: 23– 29.

- Justic, D., Rabalais, N.N., Turner, R.E., Dortch, Q.** 1995. Changes in nutrient structure of river-dominated coastal waters: Stoichiometric nutrient balance and its consequences. *Estuarine Coastal Shelf Sci.* 40:339–356.
- Khavazi, K., Rejali, F., Seguin, P., Miransari, M.** 2007. Effects of carrier, sterilisation method, and incubation on survival of *Bradyrhizobium japonicum* in soybean (*Glycine max* L.) inoculants. *Enzyme and Microbial Technology* 41: 780–784.
- KEGG.** Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes.
- Kuykendall, D.** 2005. *Bradyrhizobium*. Jordan, 1982, 137^{VP}. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Editorial Springer US. p. 325-340
- Kuykendall, D., Young, J., Martínez, E., Kerr, A., Sawada, H.** 2005. *Rhizobium*. Frank 1889, 338. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Editorial Springer US. p. 325-340
- Madigan, M., Martinko, J., Parker, J.** 2002. *Brock. Biología de los microorganismos*. Décima Edición. Ed. Pearson.
- 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.
- 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).
- Matheus, C. K.; Van Holde, K. E.; Ahern, K. G.** 2002. *Bioquímica*. Pearson Education, S.A. Madrid.
- Matiz, A.** 2007. Pontificia Universidad Javeriana. Facultad de Ciencias. Departamento de Microbiología. *Comunicación personal*.
- Meade, J., Higgins, P., O’Gara, F.** 1985. Production and storage of *Rhizobium leguminosarum* cell concentrates for use as inoculants. *Journal of Applied Bacteriology* 58: 517–524.

- Monroy, A. Meza, R.** 2002. Evaluación de la estabilidad del método de criopreservación en glicerol para el establecimiento de un banco de cepas. Tesis de grado. Pontificia Universidad Javeriana. Bogotá, D.C., Colombia.
- Montgomery, D.** 2005. Diseño y análisis de experimentos. Editorial Jhon Wiley & Sons, INC. Sexta Edición. Estados Unidos de América. 643 p.
- Morgan, C., Herman, N., White, P., Vesey, G.** 2006. Preservation of microorganisms by drying; A review. *Journal of Microbiological Methods* 66: 183–193.
- Morteson, L. E.** 1965. *Non-Heme Iron Proteins: Role in Energy Conversion* p. 243-259, Antioch Press, Yellow *LVU-L 8''* Springs, OH
- Newton, W., Fisher, K.** 2002. Nitrogen Fixation – A General Overview in Nitrogen Fixation at the Millenium. G. Jeffery Leigh, Editor. Elsevier Publications. p. 1-34.
- Oliver, A., Anderson, B. Roddick, F.** 1999. Factors affecting the production of L-Phenylacetylcarbinol by yeast: A case study en *Microbial Physiology*. Capítulo de libro. Editado por Robert K. Poole. Academic Press. United Kingdom. 274 p.
- Pedroza, F., Elmerich, C.** 2007 Regulation of nitrogen fixation and Ammonium assimilation in associative and Endophytic nitrogen fixing bacteria. *Associative and Endophytic Nitrogen-fixing Bacteria and Cyanobacterial Associations*. Ed. Springer Netherlands. 5:41-71.
- Plackett, R., Burman, J.** 1946. The design of optimum multifactorial experiments. *Biometrika*. 33: 305-325.
- Plazas, C.** 2007. Mejoramiento de un medio de cultivo para la producción de un inoculante con base en bacterias fosfato solubilizadoras. Trabajo de Grado. Carrera de Microbiología Industrial. Pontificia Universidad Javeriana. Bogotá, D.C., Colombia.
- Presidencia de la república.** www.presidencia.gov.co
- Rebah, F, Prévost, D., Yezza, A., Tyagi, R.** 2007. Agro-industrial waste materials and wastewater sludge for rhizobial inoculant production: A review. *Bioresource Technology*. 98: 3535-3546.

- Rabalais, N.N., Wisman, W.J., Turner, R.E., Justic, D., Gupta, B., Dortch, Q.** 1996. Nutrient changes in the Mississippi River and system responses on the adjacent continental shelf. *Estuaries* 19:386–407.
- Richardson, J. Hynes, M., Oresnik, I.** 2004. A Genetic Locus Necessary for Rhamnose Uptake and Catabolism in *Rhizobium leguminosarum* bv. Trifolii. *Journal of Bacteriology*. 186 (24): 8433-8442.
- Rubio, L., Ludden, P.** 2005. Maturation of Nitrogenase: a Biochemical Puzzle. *Journal of Bacteriology*. 187 (2): 405–414.
- Safronova, V., Novikova, N.** 1996. Comparison of two methods for root nodule bacteria preservation: Lyophilization and liquid nitrogen –freezing. *Journal of Microbiological Methods* 24: 231-237.
- Sahran, H.** 1999. *Rhizobium*-Legume Symbiosis and Nitrogen Fixation Under Severe Conditions and in an Arid Climate. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. 63(4): 968–989.
- Sellstedt, A., L. Stahl, M. Mattsson, K. Jonsson, and P. Hoegberg.** 1993. Can the ¹⁵N dilution technique be used to study N₂ fixation in tropical tree symbioses as affected by water deficit? *Journal of Expedition Botanic* 44:1749–1755.
- Senthikumar, S.R., Dempsey, M., Krishnan, C., Gunasekaran, P.** 2008. Optimization of biobleaching of paper pulp in an expanded bed bioreactor with immobilized alkali stable xylanase by using response surface methodology. *Bioresour. Technol.* 99: 7781–7787.
- Simione, F. Brown, B.** 1991. *ATCC. Preservation Methods: Freezing and freezing-drying*. Second Edition. American Type Culture Collection. 135 p.
- Singh, G., Ahuja, N., Batish, M., Capalash, N., Sharma, P.** 2008. Biobleaching of wheat straw-rich soda pulp with alkalophilic laccase from c-proteobacterium JB: Optimization of process parameters using response surface methodology. *Bioresour. Technol.* 99, 7472–7479.
- Skinner, F.A., Roughley, R.J., Chandler, M.** 1977. Effect of Yeast Extract Concentration on Viability and Cell Distortion in *Rhizobium* spp. *Journal of Applied Bacteriology*. 43:287-297.

- Stowers, M.** 1985. Carbon Metabolism In *Rhizobium* Species. Annual Review. Microbiology. 39: 89-108
- 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.
- Takahashi, T., Fei Yu, Zhu, S., Moriya, J., Sumino, H., Morimoto, S., Yamaguchi, N., Kanda, T.** 2006. Beneficial Effect of Brewers' Yeast Extract on Daily Activity in a Murine Model of Chronic Fatigue Syndrome. Advance Access Publication. 3(1)109–115.
- Tejada, M., Benitez, C. González, J.** 2005. Effects of Application of Two Organomineral Fertilizers on Nutrient Leaching Losses and Wheat Crop. Agron. J. 97:960–967.
- Thomas, G.** *Calculo varias variables*. Editorial Pearson. Undécima edición. Massachusetts, USA. 1288 p.
- Torrenegra, R.** 2004. *Introducción al análisis químico moderno*. Teoría para bacteriólogos y afines. Ed. Javegraf. p. 122. Bogotá, Colombia.
- Tsuji, K., Iijima, M., Matsuzawa, H. Sakamoto, S.** 1997. Over-production of Thermus protease in dense culture of *Escherichia coli* using two carbon sources. Biotechnology Techniques. 11(6): 395-398.
- Viera, S., Souto, C., Urquiaga, S., Boddey, R.** 1995. Quantification of the contribution of N₂ fixation to tropical forage legumes and transfer to associated grass. Soil Biology & Biochemistry. 27:1193–1200.
- Vriezen, J. Bruijin, F., Nüsslein, K.** 2007. Responses of Rhizobia to Desiccation in Relation to Osmotic Stress, Oxygen, and Temperature. Applied And Environmental Microbiology. 73(11): 3451-3459.
- Wang, Z.W., Liu, X.L.** 2008. Medium optimization for antifungal active substances production from a newly isolated *Paenibacillus* sp. using response surface methodology. Bioresour. Technol. 99: 8245–8251.

Wang, T., Romero, J. 2004. Taxonomía de *Rhizobium*.
http://www.microbiologia.org.mx/microbiosenlinea/CAPITULO_12/Capitulo12.pdf.

Weiser R.S., Osterud C.M. 1945. Studies on the Death of Bacteria at Low Temperatures: I. The Influence of the Intensity of the Freezing Temperature, Repeated Fluctuations of Temperature, and the Period of Exposure to Freezing Temperatures on the Mortality of *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*. 50(4):413-39.

Wolstenholme, G., O'connor, M. 1970. *The Frozen Cell*. A ciba. Londres. Editorial Churchill.

Zahran, H. 1999. *Rhizobium*-Legume Symbiosis and Nitrogen Fixation under Severe Conditions and in an Arid Climate. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. 63(4): 968-989.

Anexos

Anexo 1. Curva de peso seco

Masa de los tubos vacíos

Tubo	X1	X2	X3	X ²	SD ²	CV ²
1	11,1236	11,1238	11,1236	11,1237	0,0001	0,0009%
2	11,2899	11,2899	11,2896	11,2897	0,0002	0,0018%
3	11,2400	11,2400	11,2398	11,2399	0,0001	0,0009%
4	11,3194	11,3209	11,3209	11,3205	0,0007	0,0064%
5	11,1777	11,1780	11,1780	11,1780	0,0002	0,0022%
6	11,1863	11,1865	11,1865	11,1865	0,0001	0,0011%
7	11,1216	11,1218	11,1218	11,1218	0,0001	0,0009%
8	11,3124	11,3128	11,3126	11,3127	0,0002	0,0020%
9	11,1646	11,1650	11,1648	11,1648	0,0002	0,0015%
10	11,2538	11,2541	11,2541	11,2541	0,0002	0,0018%
11	11,2882	11,2887	11,2887	11,2886	0,0002	0,0021%
12	10,9905	10,9908	10,9910	10,9908	0,0002	0,0020%
13	11,1512	11,1515	11,1517	11,1516	0,0003	0,0024%
14	11,2311	11,2313	11,2312	11,2312	0,0001	0,0009%
15	11,0870	11,0869	11,0872	11,0871	0,0002	0,0020%

¹Xi es la masa de cada una de las mediciones de cada tubo. ²X: media aritmética, SD: Desviación estándar y CV: Coeficiente de variación.

Masa de los tubos luego del secado

Tubo	Y1 ¹	Y2 ¹	Y3 ¹	Y ²	SD ²	CV ²
1 ³	11,1902	11,1912	11,1913	11,1909	0,0005	0,0044%
2 ³	11,3787	11,3805	11,3794	11,3795	0,0007	0,0065%
3 ³	11,3206	11,3209	11,3201	11,3205	0,0003	0,0029%
4 ³	11,4087	11,4084	11,4078	11,4083	0,0004	0,0033%
5 ³	11,2458	11,2458	11,2457	11,2458	0,0000	0,0004%
6 ³	11,2740	11,2735	11,2737	11,2737	0,0002	0,0018%
7 ³	11,2100	11,2106	11,2092	11,2099	0,0006	0,0051%
8 ³	11,4014	11,4014	11,4011	11,4013	0,0001	0,0012%
9 ³	11,2542	11,2531	11,2536	11,2536	0,0004	0,0040%
10 ³	11,3307	11,3305	11,3307	11,3306	0,0001	0,0008%
11 ⁴	11,0666	11,0669	11,0671	11,0669	0,0002	0,0019%
12 ⁴	11,3643	11,3648	11,3648	11,3646	0,0002	0,0021%
13 ⁴	11,2393	11,2396	11,2391	11,2393	0,0002	0,0018%
14 ⁴	11,3072	11,3072	11,3076	11,3073	0,0002	0,0017%
15 ⁴	11,1727	11,1725	11,1724	11,1725	0,0001	0,0011%

¹Yi es la masa de cada una de las mediciones de cada tubo. ²Y: media aritmética, SD: Desviación estándar y CV: Coeficiente de variación. ³Masa de los tubos que tenían la suspensión celular luego del secado. ⁴Masa de los tubos que contenían solución salina 0.85% luego del secado.

Datos de la curva patrón

Concentración (g/L)	Absorbancia
1,230	0,742
0,615	0,406
0,410	0,289

0,308	0,210
0,246	0,196
0,205	0,157
0,123	0,091
0,062	0,043
0,025	0,018

Anexo 2. Curva de crecimiento preliminar

Tiempo (i) (h)	Biomasa (g/L)	Desv. Estándar (g/L)	Log (Xi/Xo) ¹
0	0,000	0,000	0,000
1	0,001	0,000	0,000
2	0,005	0,000	0,699
4	0,013	0,001	1,123
7	0,022	0,001	1,351
9	0,090	0,011	1,952
10	0,168	0,025	2,224
11	0,297	0,045	2,473
12	0,410	0,056	2,613
13	0,614	0,060	2,788
14	0,862	0,046	2,936
15	0,956	0,006	2,981
16	1,147	0,023	3,059
17	1,138	0,004	3,056
19	1,157	0,020	3,063
22	1,077	0,026	3,032

¹Log(Xi/Xo) equivale al logaritmo en base 10 de la biomasa en todos los tiempo cuando t>1 dividido la biomasa de t=1.

Estadística de la cinética

Tabla ANOVA
Análisis de la Varianza

Fuente	Sumas de cuad.	Gl	Cuadrado Medio	Cociente-F	P-Valor
Entre grupos	10,4397	15	0,695979	626,18	0,0000
Intra grupos	0,0355667	32	0,00111146		
Total (Corr.)	10,4753	47			

Contraste Múltiple de Rangos

Método: 95,0 porcentaje HSD de Tukey

	Frec.	Media	Grupos homogéneos
Hora0	3	0,0001	X
Hora1	3	0,0012	X
Hora2	3	0,0052	X
Hora4	3	0,0133333	X
Hora7	3	0,0223333	X
Hora9	3	0,0893333	XX
Hora10	3	0,167667	X
Hora11	3	0,297	X
Hora12	3	0,410333	X
Hora13	3	0,614	X
Hora14	3	0,862333	X
Hora15	3	0,956333	X
Hora16	3	1,07733	X
Hora17	3	1,13833	X
Hora19	3	1,147	X
Hora22	3	1,15667	X

Anexo 3. Linealización de la fase exponencial en la cinética preliminar de crecimiento.

Tiempo (i) (h)	Biomasa (g/L)	Desv. estándar	Log(Xi/Xo) ¹
1	0,001	0,000	0,000
2	0,005	0,000	0,699
4	0,013	0,001	1,123
7	0,022	0,001	1,351
9	0,090	0,011	1,952
10	0,168	0,025	2,224
11	0,297	0,045	2,473
12	0,410	0,056	2,613
13	0,614	0,060	2,788
14	0,862	0,046	2,936
15	0,956	0,006	2,981
16	1,147	0,023	3,059

¹Log(X/Xo) equivale al logaritmo en base 10 de la biomasa en todos los tiempos cuando t>1 dividido la biomasa de t=1.

Análisis de Regresión - Modelo Lineal Y = a + b*X

Variable dependiente: Col_2
Variable independiente: Col_1

Parámetro	Estimación	Error estándar	Estadístico T	P-Valor
Ordenada	0,346207	0,103092	3,35823	0,0084
Pendiente	0,18046	0,00926813	19,471	0,0000

Análisis de la Varianza

Fuente	Suma de cuadrados	GL	Cuadrado medio	Cociente-F	P-Valor
Modelo	6,51905	1	6,51905	379,12	0,0000
Residuo	0,154757	9	0,0171953		
Total (Corr.)	6,67381	10			

Coefficiente de Correlación = 0,988338
R-cuadrado = 97,6811 porcentaje
R-cuadrado (ajustado para g.l.) = 97,4235 porcentaje
Error estándar de est. = 0,131131
Error absoluto medio = 0,0964128
Estadístico de Durbin-Watson = 1,32057 (P=0,0517)
Autocorrelación residual en Lag 1 = 0,241657

El StatAdvisor

La salida muestra los resultados del ajuste al modelo lineal para describir la relación entre Log(X/Xo) y Tiempo. La ecuación del modelo ajustado es

$$\text{Log}(X/X_o) = 0,346207 + 0,18046 \cdot \text{Tiempo}$$

Anexo 4. Estabilidad de la cepa en crioconservación.

Tabla ANOVA

Análisis de la Varianza					
Fuente	Sumas de cuad.	Gl	Cuadrado Medio	Cociente-F	P-Valor
Entre grupos	4,10073E23	6	6,83455E22	23,12	0,0000
Intra grupos	4,13922E22	14	2,95658E21		
Total (Corr.)	4,51465E23	20			

Contraste Múltiple de Rango

Método: 95,0 porcentaje HSD de Tukey

	Frec.	Media	Grupos homogéneos
Col_7= 120d	3	3,E9	X
Col_4= 15d	3	2,E11	X
Col_3= 8d	3	2,625E11	X
Col_1= 0d	3	2,825E11	X
Col_2= 1d	3	3,01667E11	X
Col_5= 30d	3	3,5E11	XX
Col_6= 60d	3	5,E11	X

Contraste	Diferencias	+/-	Límites
Col_1 - Col_2	-1,91667E10		1,51681E11
Col_1 - Col_3	2,E10		1,51681E11
Col_1 - Col_4	8,25E10		1,51681E11
Col_1 - Col_5	-6,75E10		1,51681E11
Col_1 - Col_6	*-2,175E11		1,51681E11
Col_1 - Col_7	*2,795E11		1,51681E11
Col_2 - Col_3	3,91667E10		1,51681E11
Col_2 - Col_4	1,01667E11		1,51681E11
Col_2 - Col_5	-4,83333E10		1,51681E11
Col_2 - Col_6	*-1,98333E11		1,51681E11
Col_2 - Col_7	*2,98667E11		1,51681E11
Col_3 - Col_4	6,25E10		1,51681E11
Col_3 - Col_5	-8,75E10		1,51681E11
Col_3 - Col_6	*-2,375E11		1,51681E11
Col_3 - Col_7	*2,595E11		1,51681E11
Col_4 - Col_5	-1,5E11		1,51681E11
Col_4 - Col_6	*-3,E11		1,51681E11
Col_4 - Col_7	*1,97E11		1,51681E11
Col_5 - Col_6	-1,5E11		1,51681E11
Col_5 - Col_7	*3,47E11		1,51681E11
Col_6 - Col_7	*4,97E11		1,51681E11

* indica una diferencia significativa.

Anexo 5. Plackett - Burman

Análisis de la Varianza para Recuento (UFC/mL)

Fuente	Suma de Cuadrados	G1	Cuadrado medio	F-Ratio	P-Valor
C1	9,82091E20	1	9,82091E20	0,56	0,4625
C2	9,1708E18	1	9,1708E18	0,01	0,9431
C3	2,13613E21	1	2,13613E21	1,21	0,2816
N1	1,93998E20	1	1,93998E20	0,11	0,7429
N2	1,43023E21	1	1,43023E21	0,81	0,3765
N3	7,225E15	1	7,225E15	0,00	0,9984
N4	1,30607E20	1	1,30607E20	0,07	0,7878
S	5,67084E21	1	5,67084E21	3,21	0,0851
bloques	2,80123E21	2	1,40061E21	0,79	0,4631
Error Total	4,41008E22	25	1,76403E21		
Total (corr.)	5,74551E22	35			

R-cuadrado = 23,243 por ciento
R-cuadrado (ajustado para g.l.) = 0,500211 por ciento
Error Estándar de Est. = 4,20004E10
Error absoluto de la media = 2,8805E10
Estadístico Durbin-Watson = 2,3051 (P=0,1361)
Autocorrelación residual Lag 1 = -0,181744

Resultados de la Estimación para recuento (UFC/mL)

Fila	Observados Valor	Ajustados Valor	Inf. 95,0% CL para la Media	Sup. 95,0% CL para la Media
1	1,32E10	3,41239E10	-1,36917E10	8,19394E10
2	2,08E10	1,46211E10	-3,31944E10	6,24367E10
3	2,52E10	1,78189E10	-2,99967E10	6,56344E10
4	1,84E10	3,66889E10	-1,11267E10	8,45044E10
5	2,76E10	7,25539E10	2,47383E10	1,20369E11
6	4,16E10	3,3865E10	-1,39506E10	8,16806E10
7	3,76E10	3,77289E10	-1,00867E10	8,55444E10
8	9,44E10	5,72889E10	9,47333E9	1,05104E11
9	1,32E10	6,08094E10	1,29939E10	1,08625E11
10	8,4E10	4,06678E10	-7,14778E9	8,84833E10
11	3,4E10	2,52333E10	-2,25822E10	7,30489E10
12	7,84E10	5,7E10	9,18444E9	1,04816E11
13	4,84E10	4,03322E10	-7,48334E9	8,81478E10
14	3,52E10	2,08294E10	-2,69861E10	6,8645E10
15	2,52E10	2,40272E10	-2,37883E10	7,18428E10
16	1,16E11	4,28972E10	-4,91834E9	9,07128E10
17	6,5E10	7,87622E10	3,09467E10	1,26578E11
18	6,9E10	4,00733E10	-7,74222E9	8,78889E10
19	5,83E9	4,39372E10	-3,87834E9	9,17528E10
20	7,E9	6,34972E10	1,56817E10	1,11313E11
21	1,48E11	6,70178E10	1,92022E10	1,14833E11
22	2,67E9	4,68761E10	-9,39447E8	9,46917E10
23	2,1E9	3,14417E10	-1,63739E10	7,92572E10
24	3,85E10	6,32083E10	1,53928E10	1,11024E11
25	4,E10	5,51514E10	7,33583E9	1,02967E11
26	9,33E9	3,56486E10	-1,21669E10	8,34642E10
27	5,83E10	3,88464E10	-8,96917E9	8,66619E10
28	3,02E10	5,77164E10	9,90083E9	1,05532E11
29	1,25E11	9,35814E10	4,57658E10	1,41397E11
30	2,4E10	5,48925E10	7,07694E9	1,02708E11
31	1,25E11	5,87564E10	1,09408E10	1,06572E11
32	1,25E11	7,83164E10	3,05008E10	1,26132E11
33	9,8E10	8,18369E10	3,40214E10	1,29653E11
34	5,68E10	6,16953E10	1,38797E10	1,09511E11
35	1,73E10	4,62608E10	-1,55472E9	9,40764E10
36	3,18E10	7,80275E10	3,02119E10	1,25843E11

Coef. de regresión para recuento (UFC/mL)

```

constante = 4,97786E10
C1         = -5,22306E9
C2         = 5,04722E8
C3         = 7,70306E9
N1         = -2,32139E9
N2         = -6,30306E9
N3         = -1,41667E7
N4         = 1,90472E9
S          = -1,25508E10

```

El StatAdvisor

Esta ventana muestra la ecuación de la regresión que se ajustado a los datos. La ecuación del modelo ajustado es

Recuento (UFC/mL)= 4,97786E10 - 5,22306E9*C1 + 5,04722E8*C2 + 7,70306E9*C3 - 2,32139E9*N1 - 6,30306E9*N2 - 1,41667E7*N3 + 1,90472E9*N4 - 1,25508E10*S

Efectos estimados para recuento (UFC/mL)

```

-----
promedio   = 4,97786E10 +/- 7,00006E9
C1         = -1,04461E10 +/- 1,40001E10
C2         = 1,00944E9  +/- 1,40001E10
C3         = 1,54061E10 +/- 1,40001E10
N1         = -4,64278E9  +/- 1,40001E10
N2         = -1,26061E10 +/- 1,40001E10
N3         = -2,83333E7  +/- 1,40001E10
N4         = 3,80944E9   +/- 1,40001E10
S          = -2,51017E10 +/- 1,40001E10
bloque     = -5,74056E9   +/- 1,97992E10

```

Los errores estándar están basados en un error total con 25 g.l.

Anexo 6. – Screening secundario I

Análisis de la Varianza para recuento (UFC/mL)

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado medio	F-Ratio	P-Valor
C3	3,2592E21	1	3,2592E21	3,73	0,0713
C1	1,42913E19	1	1,42913E19	0,02	0,8998
N1	5,52613E21	1	5,52613E21	6,32	0,0230
N2	4,71016E21	1	4,71016E21	5,39	0,0338
S	4,49627E20	1	4,49627E20	0,51	0,4835
Bloques	2,41022E20	2	1,20511E20	0,14	0,8722
Error Total	1,39797E22	16	8,73732E20		
Total (corr.)	2,81801E22	23			

R-cuadrado = 50,3916 por ciento
R-cuadrado (ajustado para g.l.) = 36,6115 por ciento
Error Estándar de Est. = 2,9559E10
Error absoluto de la media = 1,8958E10
Estadístico Durbin-Watson = 2,14032 (P=0,2608)
Autocorrelación residual Lag 1 = -0,200036
Resultados de la Estimación para recuento (UFC/mL)

Fila	Observados Valor	Ajustados Valor	Inf. 95,0% CL para la Media	Sup. 95,0% CL para la Media
1	3,33E9	-7,82042E9	-4,39985E10	2,83577E10
2	3,6E10	4,73779E10	1,11998E10	8,3556E10
3	4,E9	2,17413E10	-1,44369E10	5,79194E10
4	1,23E10	3,11846E10	-4,99353E9	6,73627E10
5	7,35E10	6,07463E10	2,45681E10	9,69244E10
6	5,E10	5,21613E10	1,59831E10	8,83394E10
7	2,58E10	2,56863E10	-1,04919E10	6,18644E10
8	1,E11	7,38529E10	3,76748E10	1,10031E11
9	2,67E9	-1,50442E10	-5,12223E10	2,11339E10
10	1,67E10	4,01542E10	3,97606E9	7,63323E10
11	2,67E9	1,45175E10	-2,16606E10	5,06956E10
12	1,2E10	2,39608E10	-1,22173E10	6,01389E10
13	7,E10	5,35225E10	1,73444E10	8,97006E10
14	4,82E10	4,49375E10	8,75939E9	8,11156E10
15	6,87E10	1,84625E10	-1,77156E10	5,46406E10
16	2,62E10	6,66292E10	3,04511E10	1,02807E11
17	1,5E9	-1,38929E10	-5,0071E10	2,22852E10
18	3,12E10	4,13054E10	5,12731E9	7,74835E10
19	1,E9	1,56688E10	-2,05094E10	5,18469E10
20	1,17E10	2,51121E10	-1,1066E10	6,12902E10
21	6,97E10	5,46738E10	1,84956E10	9,08519E10
22	5,E7	4,60888E10	9,91064E9	8,22669E10
23	1,42E10	1,96138E10	-1,65644E10	5,57919E10
24	1,27E11	6,77804E10	3,16023E10	1,03959E11

Coef. de regresión para recuento (UFC/mL)

constante = 3,36842E10
C3 = -1,16533E10
C1 = 7,71667E8
N1 = 1,51742E10
N2 = 1,40092E10
S = 4,32833E9

El StatAdvisor

Esta ventana muestra la ecuación de la regresión que se ajustado a los datos. La ecuación del modelo ajustado es

Recuento (UFC/mL) = 3,36842E10 - 1,16533E10*C3 + 7,71667E8*C1 + 1,51742E10*N1 + 1,40092E10*N2 + 4,32833E9*S

siendo los valores de las variables especificados en sus unidades originales.

Efectos estimados para recuento (UFC/mL)

```
-----  
promedio = 3,36842E10 +/- 6,0337E9  
C3        = -2,33067E10 +/- 1,20674E10  
C1        = 1,54333E9  +/- 1,20674E10  
N1        = 3,03483E10 +/- 1,20674E10  
N2        = 2,80183E10 +/- 1,20674E10  
S         = 8,65667E9  +/- 1,20674E10  
bloque    = -5,58333E9 +/- 1,70659E10  
bloque    = -3,28083E9 +/- 1,70659E10  
-----
```

Los errores estándar están basados en un error total con 16 g.l.

Anexo 7. Screening primario II

Análisis de la Varianza para recuento (UFC/mL)

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado medio	F-Ratio	P-Valor
C3	6,28376E21	1	6,28376E21	10,85	0,0093
N1	3,12987E21	1	3,12987E21	5,40	0,0452
N2	4,83205E21	1	4,83205E21	8,34	0,0179
bloques	1,48429E21	2	7,42145E20	1,28	0,3239
Error Total	5,21377E21	9	5,79308E20		
Total (corr.)	2,09437E22	14			

R-cuadrado = 75,1058 por ciento
R-cuadrado (ajustado para g.l.) = 68,3165 por ciento
Error Estándar de Est. = 2,40688E10
Error absoluto de la media = 1,61787E10
Estadístico Durbin-Watson = 2,61984 (P=0,0379)
Autocorrelación residual Lag 1 = -0,340221

Resultados de la Estimación para recuento (UFC/mL)

Fila	Observados Valor	Ajustados Valor	Inf. 95,0% CL para la Media	Sup. 95,0% CL para la Media
1	8,25E10	9,086E10	5,43354E10	1,27385E11
2	1,45E10	4,96E9	-3,15646E10	4,14846E10
3	1,13E10	3,176E10	7,4103E9	5,61097E10
4	4,5E10	1,27933E10	-2,37312E10	4,93179E10
5	5,5E9	1,84267E10	-1,80979E10	5,49512E10
6	1,25E11	1,118E11	7,52754E10	1,48325E11
7	1,53E10	2,59E10	-1,06246E10	6,24246E10
8	3,1E10	5,27E10	2,83503E10	7,70497E10
9	2,15E10	3,37333E10	-2,79122E9	7,02579E10
10	7,07E10	3,93667E10	2,84212E9	7,58912E10
11	1,1E11	1,1212E11	7,55954E10	1,48645E11
12	3,E10	2,622E10	-1,03046E10	6,27446E10
13	8,43E10	5,302E10	2,86703E10	7,73697E10
14	1,68E10	3,40533E10	-2,47122E9	7,05779E10
15	2,4E10	3,96867E10	3,16212E9	7,62112E10

Promedio de puntos centrales de 3 = 4,22E10
Promedio de modelos de predicciones al centro = 4,58267E10

Coef. de regresión para recuento (UFC/mL)

constante = 4,58267E10
C3 = -2,28833E10
N1 = 1,615E10
N2 = -2,00667E10

El StatAdvisor

Esta ventana muestra la ecuación de la regresión que se ajustado a los datos. La ecuación del modelo ajustado es

Recuento (UFC/mL) = 4,58267E10 - 2,28833E10*C3 + 1,615E10*N1 - 2,00667E10*N2

siendo los valores de las variables especificados en sus unidades originales.

Efectos estimados para recuento (UFC/mL)

promedio = 4,58267E10 +/- 6,21454E9
C3 = -4,57667E10 +/- 1,38961E10
N1 = 3,23E10 +/- 1,38961E10

N2 = -4,01333E10 +/- 1,38961E10
bloque = 1,37467E10 +/- 1,75774E10
bloque = 1,43867E10 +/- 1,75774E10

Los errores estándar están basados en un error total con 9 g.l.

Anexo 8. Box-Behnken

Análisis de la Varianza para recuento (UFC/mL)

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado medio	F-Ratio	P-Valor
A: N1	5,89694E21	1	5,89694E21	5,16	0,0297
B: N2	2,78361E21	1	2,78361E21	2,44	0,1280
C: C3	9,5948E21	1	9,5948E21	8,40	0,0066
AA	1,92874E21	1	1,92874E21	1,69	0,2027
AB	7,75361E21	1	7,75361E21	6,79	0,0137
AC	6,35582E21	1	6,35582E21	5,57	0,0244
BB	8,00046E20	1	8,00046E20	0,70	0,4086
BC	6,09188E20	1	6,09188E20	0,53	0,4703
CC	1,11174E20	1	1,11174E20	0,10	0,7570
bloques	4,14778E21	2	2,07389E21	1,82	0,1786
Error Total	3,76859E22	33	1,142E21		
Total (corr.)	7,78548E22	44			

R-cuadrado = 51,5946 por ciento

R-cuadrado (ajustado para g.l.) = 39,1475 por ciento

Error Estándar de Est. = 3,37935E10

Error absoluto de la media = 2,38172E10

Estadístico Durbin-Watson = 1,85746 (P=0,2261)

Autocorrelación residual Lag 1 = 0,0688816

Resultados de la Estimación para recuento (UFC/mL)

Fila	Observados Valor	Ajustados Valor	Inf. para la Media	95,0% CL	Sup. para la Media
1	1,35E10	2,62372E10	-1,10703E10		6,35447E10
2	7,5E9	1,15797E10	-2,57278E10		4,88872E10
3	4,3E10	8,23761E9	-2,90699E10		4,55451E10
4	2,18E10	1,55268E10	-2,17807E10		5,28343E10
5	7,53E10	3,72073E10	1,00906E10		6,43241E10
6	5,E10	3,39768E10	-3,33072E9		7,12843E10
7	3,47E10	1,12255E11	7,49472E10		1,49562E11
8	3,5E10	2,13905E10	-1,5917E10		5,8698E10
9	1,11E11	9,3768E10	5,64605E10		1,31076E11
10	5,02E10	4,09155E10	3,60803E9		7,8223E10
11	1,32E10	3,72073E10	1,00906E10		6,43241E10
12	2,03E10	3,72073E10	1,00906E10		6,43241E10
13	6,83E9	4,08789E10	3,57136E9		7,81864E10
14	7,37E10	6,97659E10	3,24584E10		1,07073E11
15	6,5E10	3,48764E10	-2,43114E9		7,21839E10
16	7,83E9	3,53505E10	-1,95697E9		7,2658E10
17	7,E9	2,0693E10	-1,66145E10		5,80005E10
18	1,02E10	1,73509E10	-1,99566E10		5,46584E10
19	1,28E10	2,46401E10	-1,26674E10		6,19476E10
20	9,E10	4,63207E10	1,92039E10		7,34374E10
21	7,12E10	4,30901E10	5,78261E9		8,03976E10
22	9,E10	1,21368E11	8,40605E10		1,58676E11
23	4,45E10	3,05039E10	-6,80364E9		6,78114E10
24	1,26E11	1,02881E11	6,55739E10		1,40189E11
25	4,95E10	5,00289E10	1,27214E10		8,73364E10
26	3,87E10	4,63207E10	1,92039E10		7,34374E10
27	3,5E10	4,63207E10	1,92039E10		7,34374E10
28	1,8E10	4,99922E10	1,26847E10		8,72997E10
29	6,93E10	7,88793E10	4,15718E10		1,16187E11
30	8,77E10	4,39897E10	6,6822E9		8,12972E10
31	2,02E10	4,95685E10	1,2261E10		8,6876E10
32	1,18E10	3,4911E10	-2,39647E9		7,22185E10
33	3,27E10	3,15689E10	-5,73855E9		6,88764E10
34	1,58E10	3,88581E10	1,55061E9		7,61656E10
35	1,02E11	6,05387E10	3,34219E10		8,76554E10
36	4,18E10	5,73081E10	2,00006E10		9,46156E10
37	1,75E11	1,35586E11	9,82785E10		1,72894E11
38	5,8E10	4,47219E10	7,41436E9		8,20294E10
39	1,75E11	1,17099E11	7,97919E10		1,54407E11

40	1,25E11	6,42469E10	2,69394E10	1,01554E11
41	3,02E10	6,05387E10	3,34219E10	8,76554E10
42	2,75E10	6,05387E10	3,34219E10	8,76554E10
43	3,2E10	6,42102E10	2,69027E10	1,01518E11
44	7,E10	9,30973E10	5,57898E10	1,30405E11
45	5,4E10	5,82077E10	2,09002E10	9,55152E10

 Coef. de regresión para recuento (UFC/mL)

constante = 4,80222E10
 A = 1,5675E10
 B: = 1,07696E10
 C: = -1,99946E10
 AA = 1,31956E10
 AB = 2,54192E10
 AC = -2,30142E10
 BB = -8,49861E9
 BC = -7,125E9
 CC = 3,16806E9

El StatAdvisor

Esta ventana muestra la ecuación de la regresión que se ajustado a los datos. La ecuación del modelo ajustado es

$$\begin{aligned} \text{Recuento (UFC/mL)} = & 4,80222E10 + 1,5675E10*A + 1,07696E10*B - \\ & 1,99946E10*C + 1,31956E10*A^2 + \\ & 2,54192E10*A*B - 2,30142E10*A*C - \\ & 8,49861E9*B^2 - 7,125E9*B*C + 3,16806E9*C^2 \end{aligned}$$

siendo los valores de las variables especificados en sus unidades originales.

Efectos estimados para recuento (UFC/mL)

promedio = 4,80222E10 +/- 1,12645E10
 A = 3,135E10 +/- 1,37961E10
 B = 2,15392E10 +/- 1,37961E10
 C = -3,99892E10 +/- 1,37961E10
 AA = 2,63911E10 +/- 2,03073E10
 AB = 5,08383E10 +/- 1,95107E10
 AC = -4,60283E10 +/- 1,95107E10
 BB = -1,69972E10 +/- 2,03073E10
 BC = -1,425E10 +/- 1,95107E10
 CC = 6,33611E9 +/- 2,03073E10
 bloque = -3,40311E9 +/- 1,42486E10
 bloque = 2,50329E10 +/- 1,42486E10

Los errores estándar están basados en un error total con 33 g.l.

Anexo 9. Linealización de la fase exponencial de crecimiento en el medio –LM-

Tiempo (i) (h)	Biomasa (g/L)	Desv. Est	Log(Xi/Xo) ¹
3	0,001	0,000	0,000
5	0,002	0,000	0,301
7	0,003	0,000	0,477
9	0,038	0,005	1,578
11	0,190	0,090	2,278
13	0,620	0,301	2,792
15	0,839	0,333	2,924
17	1,197	0,529	3,078

¹Log(X/Xo) equivale al logaritmo en base 10 de la biomasa en todos los tiempos cuando t>3 dividido la biomasa de t=1.

Análisis de Regresión - Modelo Lineal $Y = a + b \cdot X$

 Variable dependiente: Biomasa
 Variable independiente: Tiempo

Parámetro	Estimación	Error estándar	Estadístico	
			T	P-Valor
Ordenada	-0,839714	0,273724	-3,06774	0,0220
Pendiente	0,251821	0,024884	10,1198	0,0001

Análisis de la Varianza

Fuente	Suma de cuadrados	GL	Cuadrado medio	Cociente-F	P-Valor
Modelo	10,6536	1	10,6536	102,41	0,0001
Residuo	0,624167	6	0,104028		
Total (Corr.)	11,2777	7			

 Coeficiente de Correlación = 0,971934
 R-cuadrado = 94,4655 porcentaje
 R-cuadrado (ajustado para g.l.) = 93,5431 porcentaje
 Error estándar de est. = 0,322533
 Error absoluto medio = 0,235321
 Estadístico de Durbin-Watson = 1,28857 (P=0,0449)
 Autocorrelación residual en Lag 1 = 0,244328

El StatAdvisor

 La salida muestra los resultados del ajuste al modelo lineal para describir la relación entre Col_2 y Col_1. La ecuación del modelo ajustado es

$$\text{Col}_2 = -0,839714 + 0,251821 \cdot \text{Col}_1$$

Dado que el p-valor en la tabla ANOVA es inferior a 0.01, existe relación estadísticamente significativa entre Col_2 y Col_1 para un nivel de confianza del 99%.

Anexo 10. Linealización de las fases exponenciales de crecimiento en el medio alterno.

Linealización de toda la fase exponencial:

Tiempo (i) (h)	Biomasa (g/L)	Desv. Est (g/L)	LOG(Xi/Xo) ¹
3	0,001	0,000	0,000
5	0,002	0,000	0,301
7	0,003	0,000	0,477
9	0,016	0,024	1,206
11	0,018	0,017	1,249
13	0,122	0,002	2,088
15	0,401	0,026	2,604
17	0,432	0,014	2,636
19	0,707	0,033	2,850
21	0,889	0,037	2,949
23	1,024	0,040	3,010
25	1,186	0,106	3,074

¹Log(X/Xo) equivale al logaritmo en base 10 de la biomasa en todos los tiempos cuando t>3 dividido la biomasa de t=1.

Análisis de Regresión - Modelo Lineal Y = a + b*X

Variable dependiente: Col_2
Variable independiente: Col_1

Parámetro	Estimación	Error estándar	Estadístico T	P-Valor
Ordenada	-0,29302	0,217568	-1,3468	0,2078
Pendiente	0,154529	0,0139379	11,0869	0,0000

Análisis de la Varianza

Fuente	Suma de cuadrados	GL	Cuadrado medio	Cociente-F	P-Valor
Modelo	13,6588	1	13,6588	122,92	0,0000
Residuo	1,11119	10	0,111119		
Total (Corr.)	14,77	11			

Coefficiente de Correlación = 0,961648
R-cuadrado = 92,4767 porcentaje
R-cuadrado (ajustado para g.l.) = 91,7244 porcentaje
Error estándar de est. = 0,333346
Error absoluto medio = 0,261376
Estadístico de Durbin-Watson = 0,755454 (P=0,0016)
Autocorrelación residual en Lag 1 = 0,49838

El StatAdvisor

La salida muestra los resultados del ajuste al modelo lineal para describir la relación entre Col_2 y Col_1. La ecuación del modelo ajustado es

$$\text{Col}_2 = -0,29302 + 0,154529 \cdot \text{Col}_1$$

Dado que el p-valor en la tabla ANOVA es inferior a 0.01, existe relación estadísticamente significativa entre Col_2 y Col_1 para un nivel de confianza del 99%.

Linealización de la fase exponencial en el medio alterno antes de la diauxia.

Tiempo (i) (h)	Biomasa (g/L)	Desv. Est (g/L)	LOG(Xi/Xo)
3	0,001	0,000	0,000
5	0,002	0,000	0,301
7	0,003	0,000	0,477
9	0,016	0,024	1,206
11	0,018	0,017	1,249
13	0,122	0,002	2,088
15	0,401	0,026	2,604

¹Log(X/Xo) equivale al logaritmo en base 10 de la biomasa en todos los tiempos cuando t>3 dividido la biomasa de t=1.

Análisis de Regresión - Modelo Lineal $Y = a + b \cdot X$

 Variable dependiente: Biomasa (g/L)
 Variable independiente: Tiempo (h)

Parámetro	Estimación	Error estándar	Estadístico T	P-Valor
Ordenada	-0,821617	0,195799	-4,19623	0,0085
Pendiente	0,217098	0,0198804	10,9202	0,0001

Análisis de la Varianza

Fuente	Suma de cuadrados	GL	Cuadrado medio	Cociente-F	P-Valor
Modelo	5,27871	1	5,27871	119,25	0,0001
Residuo	0,221328	5	0,0442656		
Total (Corr.)	5,50004	6			

 Coeficiente de Correlación = 0,979673
 R-cuadrado = 95,9759 porcentaje
 R-cuadrado (ajustado para g.l.) = 95,1711 porcentaje
 Error estándar de est. = 0,210394
 Error absoluto medio = 0,153691
 Estadístico de Durbin-Watson = 2,23481 (P=0,1693)
 Autocorrelación residual en Lag 1 = -0,247321

El StatAdvisor

 La salida muestra los resultados del ajuste al modelo lineal para describir la relación entre Col_4 y Col_3. La ecuación del modelo ajustado es

$$\text{Col}_4 = -0,821617 + 0,217098 \cdot \text{Col}_3$$

Dado que el p-valor en la tabla ANOVA es inferior a 0.01, existe relación estadísticamente significativa entre Col_4 y Col_3 para un nivel de confianza del 99%.

Linealización de la fase exponencial en el medio alterno después de la diauxia.

Tiempo (i) (h)	Biomasa (g/L)	Desv. Est (g/L)	LOG(Xi/Xo)
17	0,432	0,014	2,636
19	0,707	0,033	2,850
21	0,889	0,037	2,949
23	1,024	0,040	3,010
25	1,186	0,106	3,074

¹Log(X/X₀) equivale al logaritmo en base 10 de la biomasa en todos los tiempos cuando t>17 dividido la biomasa de t=1.

Análisis de Regresión - Modelo Lineal Y = a + b*X

Variable dependiente: Biomasa (g/L)

Variable independiente: Tiempo (h)

Parámetro	Estimación	Error estándar	Estadístico T	P-Valor
Ordenada	1,81522	0,188877	9,6106	0,0024
Pendiente	0,0518345	0,00891366	5,81518	0,0101

Análisis de la Varianza

Fuente	Suma de cuadrados	GL	Cuadrado medio	Cociente-F	P-Valor
Modelo	0,107473	1	0,107473	33,82	0,0101
Residuo	0,0095344	3	0,00317813		
Total (Corr.)	0,117007	4			

Coefficiente de Correlación = 0,958392

R-cuadrado = 91,8514 porcentaje

R-cuadrado (ajustado para g.l.) = 89,1352 porcentaje

Error estándar de est. = 0,0563749

Error absoluto medio = 0,0390288

Estadístico de Durbin-Watson = 1,62579 (P=0,0701)

Autocorrelación residual en Lag 1 = -0,0767905

El StatAdvisor

La salida muestra los resultados del ajuste al modelo lineal para describir la relación entre Col_6 y Col_5. La ecuación del modelo ajustado es

$$\text{Col}_6 = 1,81522 + 0,0518345 * \text{Col}_5$$

Dado que el p-valor en la tabla ANOVA es inferior a 0.05, existe relación estadísticamente significativa entre Col_6 y Col_5 para un nivel de confianza del 95%.

Anexo 11. Estabilidad de la cepa C50 en turba

Comparación de la estabilidad en el medio inoculado con el medio alterno vs. el tradicional:

Resumen Estadístico

	Frecuencia	Media	Varianza	Desviación típica	Mínimo
DR0	3	3,91667E12	1,00208E25	3,16557E12	1,5E12
DR15	4	1,4625E12	1,08729E24	1,04273E12	5,5E11
DR30	5	2,21E12	1,81925E24	1,3488E12	5,E11
YMA0	3	3,E12	3,25E24	1,80278E12	1,5E12
YMA15	4	2,1125E12	1,48958E23	3,85951E11	1,65E12
YMA30	5	1,33E12	3,0575E23	5,52947E11	7,5E11
Total	24	2,19792E12	2,41315E24	1,55343E12	5,E11

	Máximo	Rango	Asimetría tipi.	Curtosis típicada
DR0	7,5E12	6,E12	1,01343	
DR15	2,7E12	2,15E12	0,343184	-1,44706
DR30	3,4E12	2,9E12	-0,501758	-1,21387
YMA0	5,E12	3,5E12	0,814636	
YMA15	2,5E12	8,5E11	-0,299579	-1,08444
YMA30	2,15E12	1,4E12	0,751823	-0,0902142
Total	7,5E12	7,E12	3,87822	5,17131

Tabla ANOVA

Análisis de la Varianza					
Fuente	Sumas de cuad.	Gl	Cuadrado Medio	Cociente-F	P-Valor
Entre grupos	1,6752E25	5	3,3504E24	1,56	0,2226
Intra grupos	3,87504E25	18	2,1528E24		
Total (Corr.)	5,55024E25	23			

Contraste Múltiple de Rango

Método: 95,0 porcentaje HSD de Tukey

	Frec.	Media	Grupos homogéneos
YMA30	5	1,33E12	X
DR15	4	1,4625E12	X
YMA15	4	2,1125E12	X
DR30	5	2,21E12	X
YMA0	3	3,E12	X
DR0	3	3,91667E12	X

Contraste	Diferencias	+/- Límites
DR0 - DR15	2,45417E12	3,56261E12
DR0 - DR30	1,70667E12	3,40651E12
DR0 - YMA0	9,16667E11	3,80859E12
DR0 - YMA15	1,80417E12	3,56261E12
DR0 - YMA30	2,58667E12	3,40651E12
DR15 - DR30	-7,475E11	3,12908E12
DR15 - YMA0	-1,5375E12	3,56261E12
DR15 - YMA15	-6,5E11	3,29833E12
DR15 - YMA30	1,325E11	3,12908E12
DR30 - YMA0	-7,9E11	3,40651E12
DR30 - YMA15	9,75E10	3,12908E12
DR30 - YMA30	8,8E11	2,95012E12
YMA0 - YMA15	8,875E11	3,56261E12
YMA0 - YMA30	1,67E12	3,40651E12
YMA15 - YMA30	7,825E11	3,12908E12

* indica una diferencia significativa.

Tabla de Medias
con 95,0 intervalos HSD de Tukey

	Frec.	Media	Error Estándar (s agrupada)	Límite inf.	Límite sup.
DR0	3	3,91667E12	8,47113E11	2,01237E12	5,82096E12
DR15	4	1,4625E12	7,33621E11	-1,86667E11	3,11167E12
DR30	5	2,21E12	6,56171E11	7,3494E11	3,68506E12
YMA0	3	3,E12	8,47113E11	1,09571E12	4,90429E12
YMA15	4	2,1125E12	7,33621E11	4,63333E11	3,76167E12
YMA30	5	1,33E12	6,56171E11	-1,4506E11	2,80506E12
Total	24	2,19792E12			

Anexo 12. Crecimiento de las cepas de rizobios sobre el medio de cultivo alterno

1. Estadística sobre la cepa J01

Resumen Estadístico

	DR'J01	LM'J01
Frecuencia	8	8
Media	1,96875E10	2,225E10
Varianza	5,63839E18	3,21429E18
Desviación típica	2,37453E9	1,79284E9
Mínimo	1,45E10	2,05E10
Máximo	2,25E10	2,5E10
Rango	8,E9	4,5E9
Asimetría tipi.	-1,82559	1,145
Curtosis típicada	2,14095	-0,265838

Comparación de Medias

95,0% intervalo de confianza para la media de DR'J01: 1,96875E10 +/- 1,98516E9
[1,77023E10,2,16727E10]

95,0% intervalo de confianza para la media de LM'J01: 2,225E10 +/- 1,49886E9
[2,07511E10,2,37489E10]

95,0% intervalos de confianza para la diferencia de medias:
suponiendo varianzas iguales: -2,5625E9 +/- 2,2562E9 [-4,8187E9,-3,06301E8]

contrastes t de comparación de medias

Hipótesis nula: medial = media2

Hipótesis alt.: medial <> media2

suponiendo varianzas iguales: t = -2,43597 P-Valor = 0,0288108

Comparación de Desviaciones Típicas

	DR'J01	LM'J01
Desviación Típica	2,37453E9	1,79284E9
Varianza	5,63839E18	3,21429E18
GL	7	7

Cociente de varianzas = 1,75417

95,0% Intervalos de Confianza

Desviación Típica deDR'J01: [1,56998E9,4,83281E9]

Desviación Típica deLM'J01: [1,18538E9,3,64892E9]

Cociente de varianzas: [0,351191,8,7619]

Contrastes F para comparar varianzas

Hipótesis nula: signal = sigma2

(1) Hipótesis alt.: signal <> sigma2

F = 1,75417 P-Valor = 0,475854

2. Estadística sobre la cepa C2

Resumen Estadístico

	DR'C2	LM'C2
Frecuencia	7	7
Media	2,15E10	4,71429E9
Varianza	1,36667E19	1,82143E18
Desviación típica	3,69685E9	1,3496E9
Mínimo	1,7E10	3,5E9
Máximo	2,7E10	7,5E9
Rango	1,E10	4,E9
Asimetría tipi.	0,325489	1,8486
Curtosis típicada	-0,705759	1,98978


```

-----
Comparación de Medias
-----
95,0% intervalo de confianza para la media de DR'C2: 2,15E10 +/- 3,41902E9
[1,8081E10,2,4919E10]
95,0% intervalo de confianza para la media de LM'C2: 4,71429E9 +/- 1,24818E9
[3,46611E9,5,96246E9]
95,0% intervalos de confianza para la diferencia de medias:
suponiendo varianzas iguales: 1,67857E10 +/- 3,24094E9 [1,35448E10,2,00267E10]

contrastes t de comparación de medias

Hipótesis nula: media1 = media2
Hipótesis alt.: media1 <> media2
suponiendo varianzas iguales: t = 11,2847 P-Valor = 9,56171E-8

Comparación de Desviaciones Típicas
-----
DR'C2 LM'C2
-----
Desviación Típica 3,69685E9 1,3496E9
Varianza 1,36667E19 1,82143E18
GL 6 6

Cociente de varianzas = 7,50327

95,0% Intervalos de Confianza
Desviación Típica deDR'C2: [2,38222E9,8,14069E9]
Desviación Típica deLM'C2: [8,69675E8,2,97191E9]
Cociente de varianzas: [1,28927,43,6672]

Contrastes F para comparar varianzas

Hipótesis nula: sigma1 = sigma2
(1) Hipótesis alt.: sigma1 <> sigma2
F = 7,50327 P-Valor = 0,0270609

```

3. Estadística sobre la cepa T14

```

Resumen Estadístico
DR'T14 LM'T14
-----
Frecuencia 6 6
Media 4,525E10 2,9E10
Varianza 1,56675E20 3,862E20
Desviación típica 1,2517E10 1,9652E10
Mínimo 3,3E10 1,05E10
Máximo 6,65E10 5,25E10
Rango 3,35E10 4,2E10
Asimetría tipi. 1,08421 0,283296
Curtosis típificada 0,265843 -1,31691
-----

Comparación de Medias
-----
95,0% intervalo de confianza para la media de DR'T14: 4,525E10 +/- 1,31358E10
[3,21142E10,5,83858E10]
95,0% intervalo de confianza para la media de LM'T14: 2,9E10 +/- 2,06235E10
[8,37646E9,4,96235E10]
95,0% intervalos de confianza para la diferencia de medias:
suponiendo varianzas iguales: 1,625E10 +/- 2,11942E10 [-4,94423E9,3,74442E10]

contrastes t de comparación de medias

Hipótesis nula: media1 = media2
Hipótesis alt.: media1 <> media2
suponiendo varianzas iguales: t = 1,70836 P-Valor = 0,118369

Comparación de Desviaciones Típicas
-----

```

	DR'T14	LM'T14
Desviación Típica	1,2517E10	1,9652E10
Varianza	1,56675E20	3,862E20
GL	5	5

Cociente de varianzas = 0,405684

95,0% Intervalos de Confianza

Desviación Típica deDR'T14: [7,8132E9,3,06993E10]

Desviación Típica deLM'T14: [1,22669E10,4,81987E10]

Cociente de varianzas: [0,0567674,2,89918]

Contrastes F para comparar varianzas

Hipótesis nula: $\sigma_1 = \sigma_2$

(1) Hipótesis alt.: $\sigma_1 <> \sigma_2$

F = 0,405684 P-Valor = 0,344642

4. Estadística sobre la cepa C50

Resumen Estadístico

	LM'C50	DR'C50
Frecuencia	6	8
Media	2,94167E10	2,24375E10
Varianza	2,70742E20	4,40313E19
Desviación típica	1,64542E10	6,6356E9
Mínimo	1,35E10	1,35E10
Máximo	5,E10	3,E10
Rango	3,65E10	1,65E10
Asimetría tipi.	0,713665	-0,537547
Curtosis típicada	-0,946392	-1,13929

Comparación de Medias

95,0% intervalo de confianza para la media de LM'C50: 2,94167E10 +/- 1,72677E10 [1,2149E10,4,66844E10]

95,0% intervalo de confianza para la media de DR'C50: 2,24375E10 +/- 5,54752E9 [1,689E10,2,7985E10]

95,0% intervalos de confianza para la diferencia de medias:

suponiendo varianzas iguales: 6,97917E9 +/- 1,38478E10 [-6,8686E9,2,08269E10]

contrastes t de comparación de medias

Hipótesis nula: $\mu_1 = \mu_2$

Hipótesis alt.: $\mu_1 <> \mu_2$

suponiendo varianzas iguales: t = 1,09811 P-Valor = 0,293703

Comparación de Desviaciones Típicas

	LM'C50	DR'C50
Desviación Típica	1,64542E10	6,6356E9
Varianza	2,70742E20	4,40313E19
GL	5	7

Cociente de varianzas = 6,14885

95,0% Intervalos de Confianza

Desviación Típica deLM'C50: [1,02709E10,4,03559E10]

Desviación Típica deDR'C50: [4,38729E9,1,35053E10]

Cociente de varianzas: [1,1634,42,1388]

Contrastes F para comparar varianzas

Hipótesis nula: $\sigma_1 = \sigma_2$

(1) Hipótesis alt.: $\sigma_1 <> \sigma_2$

F = 6,14885 P-Valor = 0,337725