

## ARTÍCULO CIENTÍFICO

## Sequential statistical design application in identification of *Azotobacter chroococcum* AC1 nutritional sources

## Aplicación de diseños estadísticos secuenciales en la identificación de fuentes nutricionales para *Azotobacter chroococcum* AC1

Andrés Eduardo Moreno G.<sup>1</sup>, Daniel Fernando Rojas T.<sup>1</sup>,  
Ruth Rebeca Bonilla B.<sup>1,2</sup>

## ABSTRACT

The mass multiplication of plant growth promoting bacteria is a fundamental aspect in the production of bioinoculants. In order to evaluate an experimental strategy that would identify nutritional factors that influence the growth of *Azotobacter chroococcum* AC1 strain, the sequential application of statistical designs (Plackett-Burman design,  $2^{7-3}$  factorial design, steepest ascent method, and response surface analysis) was performed. Eleven nutritional sources: glucose, sucrose, glycerol, starch, monosodium glutamate, urea, commercial yeast, yeast extract,  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ ,  $K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$ , and mineral solution were evaluated. Sequential statistical design application proved to be a reliable experimental strategy, allowing  $9 \times 10^9$  cfu/mL production from an optimal ration between yeast extract, monosodium glutamate, glucose,  $K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$ ,  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ , and mineral solution.

**Keywords:** *Azotobacter chroococcum*, Plackett-Burman design, factorial design, steepest ascent method, response surface analysis.

## RESUMEN

La multiplicación masiva de bacterias promotoras de crecimiento vegetal es un aspecto fundamental para la producción de bioinoculantes. Con el objetivo de evaluar una estrategia experimental que permitiera identificar factores nutricionales con influencia sobre la multiplicación de *Azotobacter chroococcum* AC1, se realizó la aplicación secuencial de diseños estadísticos (Plackett-Burman, diseño factorial  $2^{7-3}$ , máxima respuesta ascendente y análisis de superficie de respuesta). Se evaluaron once fuentes nutricionales: glucosa, sacarosa, glicerol, almidón, glutamato monosódico, urea, levadura comercial entera, extracto de levadura,  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ ,  $K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$  y solución de microelementos. Los resultados evidenciaron que la aplicación en secuencia de diseños estadísticos demostró ser una estrategia confiable permitiendo una producción de células viables de  $9 \times 10^9$  ufc/mL luego de 24 horas del proceso de multiplicación, empleando una combinación óptima estimada basada en extracto de levadura, glutamato monosódico, glucosa,  $K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$ ,  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  y solución de micronutrientes.

**Palabras clave:** *Azotobacter chroococcum*, diseño Plackett-Burman, diseño factorial fraccionado, máxima respuesta ascendente, superficie de respuesta.

## INTRODUCCIÓN

El uso de diseños estadísticos experimentales en la optimización de los niveles de factores asociados diferentes procesos permitiendo maximizar sus resultados, ha sido bien documentado; estudios de implementación de un único diseño como los de Altaf *et al.* (2007), Isar *et al.* (2006), Aktas *et al.* (2006) en los cuales se utilizó el diseño estadístico de superficie de respuesta permitieron optimizar combinaciones de factores en la producción de ácido láctico, ácido succínico y *Kluyveromyces marxianus*, respectivamente; mientras la combinación de varios diseños como la de Xu *et al.* (2006) donde se emplearon los diseños Plackett-Burman y superficie de respuesta permitió optimizar la producción de taxol con *Fusarium maire*, la combinación de otros diseños con el método de paso ascendente empleado por Gao y Gu (2007),

Fecha de recepción: 02/10/2011  
Fecha de aceptación: 22/11/2011

<sup>1</sup> Laboratorio de Microbiología de Suelos, Centro de Biotecnología y Bioindustria - CBB, Centro de Investigación Tibaitatá, Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria - Corpoica. Mosquera (Colombia).

<sup>2</sup> Autor para correspondencia: rbonilla@corpoica.org.co

fue utilizado en la optimización de la producción de polisacáridos y ergosterol.

A pesar que los diseños estadísticos son ampliamente empleados, pocos trabajos aplican estos diseños de forma correcta (Ren *et al.*, 2008). Una selección y aplicación de diseños debe realizarse de forma secuencial, lo cual permite la determinación de niveles y factores que influyen sobre la respuesta óptima de una variable determinada. La modificación y variación de fuentes nutricionales ha sido empleada para maximizar la producción de biomasa en bacterias promotoras de crecimiento vegetal (PGPR del inglés *Plant Growth Promoting Rhizobacteria*) (Ryu *et al.*, 2008; Rojas *et al.*, 2009), las PGPR son el componente principal de los biofertilizantes, los cuales basan su principio activo en un elevado número de células y son considerados como un importante componente del manejo integrado de cultivos (Fuentes-Ramírez y Caballero-Mellado, 2005).

*Azotobacter chroococcum* está catalogada como una PGPR con amplio efecto sobre diferentes cultivos como avena, algodón, maíz, trigo, entre otros (Kızılkaya, 2008); sus atributos de promoción de crecimiento tales como fijación biológica de nitrógeno, producción de compuestos indólicos, solubilización de fósforo, producción de sideróforos (Remus *et al.*, 2000; Kennedy *et al.*, 2005; Becking, 2006), la han designado como principio activo de en la formulación de biofertilizantes, procesos de bioremediación y producción de polímeros (Myshkina *et al.*, 2008).

Con el objetivo de evaluar la aplicación secuencial de diseños estadísticos que permitieran identificar fuentes nutricionales asociadas a la multiplicación de *Azotobacter chroococcum* AC1, mediante (1) la optimización de los niveles de fuentes nutricionales para este microorganismo mediante la aplicación secuencial de diseños estadísticos y (2) la maximización en la producción de biomasa.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Microorganismo y condiciones de cultivo

La cepa AC1 de *Azotobacter chroococcum* (Bonilla y Novo, 2001), se obtuvo 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. Esta fue reactivada en placas de medio Ashby (Fenglerowa, 1965) durante 48 h a  $28 \pm 2^\circ\text{C}$ . Los inóculos fueron preparados en medio Burks (Quagliano *et al.*, 2001), durante 48 h a  $28 \pm 2^\circ\text{C}$  y agitación orbital de 120 rpm.

### Estrategia experimental

Se aplicaron diseños estadísticos secuenciales para investigar el efecto de diversas fuentes nutricionales sobre la producción de células viables de la cepa AC1 de *Azotobacter chroococcum*. El proceso de optimización involucró la identificación de aquellos sustratos con efecto positivo sobre la variable de respuesta (biomasa) mediante un experimento de *screening* y depuración (diseño Plackett-Burman), luego fue aplicado un enfoque e identificación de las interacciones con efecto significativo sobre el subconjunto previo de fuentes nutricionales (diseño factorial fraccionado). Este conjunto de fuentes se evaluó con el fin de direccionar el modelo hacia una región óptima, incrementando gradualmente la concentración de los sustratos en magnitudes iguales (método de paso ascendente), y se identificaron las combinaciones que optimizaban la producción de biomasa mediante el análisis de superficie de respuesta (Box-Behnken) de las fuentes nutricionales seleccionadas.

### Condiciones experimentales

Todos los tratamientos fueron evaluados por triplicado en erlenmeyers de 125 mL con 25 mL de la solución de nutrientes. Cada erlenmeyer fue inoculado con 250  $\mu\text{L}$  de un cultivo Overnight de la cepa AC1 de *A. chroococcum* ajustado a densidad óptica  $(\text{DO})_{540\text{ nm}} = 0,2$  con medio estéril. Las condiciones estándar fueron  $28 \pm 2^\circ\text{C}$ , 120 rpm de agitación orbital y 24 h de fermentación. La concentración celular de biomasa viable (ufc/mL) fue determinada por medio de la técnica de microgota (Doyle, 2001). La concentración de biomasa en peso seco ( $\text{g L}^{-1}$ ) se determinó por densidad óptica ( $\lambda=540\text{ nm}$ ) (Juarez *et al.*, 2005; Rojas *et al.*, 2009). No se realizó control ni ajuste de pH en ningún diseño experimental durante el tiempo de estudio, debido a que el microorganismo debe seleccionar aquellas fuentes que le brinden tanto un aporte nutricional como un entorno bioquímico adecuado.

### Cinética de crecimiento del microorganismo

Se llevó a cabo una comparación del crecimiento del microorganismo empleando las condiciones nutricionales optimizadas y un medio alternativo diseñado por Bonilla y Pedroza (2003) denominado medio Agrícola. Cada cinética se realizó por triplicado empleando erlenmeyers de 1000 mL con 200 mL de medio de cultivo, la inoculación y el proceso de fermentación se realizó acorde a las condiciones experimentales previas. Se evaluó la producción de biomasa viable (ufc/mL) y en peso seco ( $\text{g L}^{-1}$ ) y se realizó la detección de azúcares reductores mediante la técnica del ácido 3,4-dinitrosalicílico (DNS) (Ferrer *et al.*, 2002), para determinar la concentración y consumo de azúcares durante el tiempo de fermentación.

### Análisis estadístico

Los diseños estadísticos experimentales empleados en este estudio fueron generados empleando StatGraphics (versión 15.2.05, Statpoint) y SPSS (versión 17.0, SPSS).

### RESULTADOS Y DISCUSIÓN

#### Fase de Screening: Diseño Plackett-Burman

Se seleccionaron once fuentes nutricionales acordes con las características metabólicas de *Azotobacter chroococcum* (Kennedy *et al.*, 2005; Overmann 2006) para ser empleadas en el experimento de *screening*. La composición de la solución de microelementos fue (g/100 mL): 2,5 NaCl, 2,5 CaCl<sub>2</sub>, 0,25 FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O y 0,15 Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O. Las concentraciones fueron ajustadas manteniendo: (1) una relación carbono/nitrógeno (C:N) de 20:1 (Ryu *et al.*, 2008), cuando hubo presente más de una fuente de carbono o nitrógeno las concentraciones se ajustaron para mantener la relación, (2) los niveles empleados fueron alto (+1) y bajo (-1) de manera que el nivel alto correspondiera para carbono y nitrógeno a la relación 20:1, mientras el nivel bajo fue un 20% de las concentraciones del nivel alto, (3) se empleó como una medida para el *screening* de fuentes la producción de biomasa en peso seco (g L<sup>-1</sup>). La matriz de concentraciones y los resultados de biomasa se presentan en la Tabla 1.

**Tabla 1.** Diseño experimental Plackett-Burkman y niveles de factor

Factores codificados											Biomasa en peso seco (g L <sup>-1</sup> )	
A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	Observados	Predichos
+1	+1	-1	+1	+1	-1	+1	-1	-1	-1	+1	1,375	0,738
+1	-1	+1	+1	-1	+1	-1	-1	-1	+1	+1	0,648	0,346
+1	-1	-1	-1	+1	+1	+1	-1	+1	+1	-1	1,440	0,776
-1	+1	+1	-1	-1	+1	+1	-1	+1	-1	-1	1,081	0,564
+1	+1	+1	+1	+1	-1	-1	+1	-1	-1	-1	0,672	0,360
-1	-1	+1	+1	+1	-1	+1	+1	-1	+1	-1	1,570	0,853
-1	+1	-1	-1	-1	+1	+1	+1	-1	+1	+1	1,123	0,589
-1	+1	+1	-1	+1	-1	-1	-1	+1	+1	+1	1,156	0,609
+1	+1	-1	+1	-1	-1	-1	+1	+1	+1	-1	0,622	0,330
-1	-1	-1	+1	+1	+1	-1	+1	+1	-1	+1	1,101	0,576
-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	0,597	0,315
+1	-1	+1	-1	-1	-1	+1	+1	+1	-1	+1	0,993	0,512

A: glucosa; B: sacarosa; C: glicerol; D: almidón; E: glutamato; F: urea; G: extracto de levadura; H: levadura comercial; I: MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O; J: K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·3H<sub>2</sub>O; K: solución de microelementos.

El diseño Plackett-Burman (P-B) es de resolución III, esto significa que los efectos principales no son confundidos entre sí, pero se confunden con una o más interacciones secundarias, estas son asumidas como cero por el diseño para que los efectos principales sean significativos. Los efectos principales y el análisis de varianza del diseño son mostrados en la Tabla 2.

**Tabla 2.** Efectos principales y niveles del diseño Plackett-Burman para biomasa

Fuente	Valor-P	Efecto	Nivel alto (+1)	Nivel bajo (-1)	Razón-F
A: Glucosa	0,000	-0,074	2,50	0,50	53.590
B: Sacarosa	0,005	-0,032	2,38	0,48	9.790
C: Glicerol	0,190	-0,014	2,55	0,51	1.830
D: Almidón	0,001	0,041	2,50	0,50	16.550
E: Glutamato	0,000	0,209	0,60	0,12	430.020
F: Urea	0,024	-0,024	0,01	0,002	5.880
G: Extracto de levadura	0,000	0,249	0,64	0,128	609.960
H: Levadura comercial	0,045	-0,021	0,65	0,133	4.500
I: MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0,012	0,028	0,2	0,04	7.540
J: K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ·3H <sub>2</sub> O	0,000	0,073	0,2	0,04	52.320
K: Microelementos <sup>a</sup>	0,011	0,028	4,0	0,8	7.830

<sup>a</sup>P = 98,19%; <sup>b</sup>P (ajustado) = 97,37%, <sup>c</sup>volumen (mL) de la solución de microelementos

Las fuentes nutricionales con efecto positivo ( $P \leq 0,05$ ) sobre la producción de biomasa fueron: almidón, glutamato, extracto de levadura, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·3H<sub>2</sub>O, MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O y solución de microelementos, las fuentes restantes presentaron un efecto negativo o no significativo y fueron removidas del estudio. Sin embargo, la capacidad de asimilar almidón permitió que la glucosa se mantuviera dentro del estudio, atribuyendo su efecto negativo a efectos confundidos en interacciones secundarias, ya que el producto de la hidrólisis del almidón es glucosa.

#### Fase primaria de optimización: diseño factorial

Debido a la cantidad de factores significativos y a la resolución del diseño P-B, se empleó un diseño factorial de resolución IV, lo que significa que los efectos principales no se confunden entre ellos ni con otras interacciones de nivel secundario, sin embargo las interacciones secundarias pueden confundirse con otras del mismo tipo. Se evaluaron mediante un diseño factorial 2<sup>7-3</sup>, siete fuentes nutricionales: glucosa, almidón, glutamato monosódico, extracto de levadura, MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·3H<sub>2</sub>O y solución de micronutrientes. Se mantuvieron dos niveles alto (+1) y bajo (-1), donde el nivel alto se estableció como la mayor concentración (nivel +1) del diseño de *screening* y el nivel bajo como la quinta parte del nivel alto. Este y los demás diseños aplicados emplearon la producción de células viables (ufc/mL) como variable de respuesta. La Tabla 3 muestra los resultados observados y predichos en la producción de células viables, así como la composición de la matriz del diseño factorial.

La Tabla 4 muestra los efectos principales e interacciones secundarias asociadas a la producción de células viables del diseño factorial, donde las fuentes con efecto positivo ( $P \leq 0,05$ ) sobre la producción de células viables (ufc/mL) fueron: extracto de levadura, glutamato, y microelementos. El almidón fue removido del estudio, mientras la glucosa,

**Tabla 3** Diseño factorial 2<sup>7-3</sup>, resultados de biomasa viable y matriz factorial

Corrida	Factores codificados							Células viables (ufc/mL)	
	A	B	C	D	E	F	G	Observados	Predichos
1	1	-1	1	-1	-1	1	-1	2,78x10 <sup>10</sup>	2,39x10 <sup>10</sup>
2	1	1	1	-1	1	-1	-1	3,00x10 <sup>11</sup>	3,24x10 <sup>10</sup>
3	-1	1	-1	1	1	-1	1	2,94x10 <sup>10</sup>	2,77x10 <sup>10</sup>
4	1	-1	-1	1	1	1	-1	2,33x10 <sup>10</sup>	2,20x10 <sup>10</sup>
5	-1	1	-1	-1	1	1	-1	2,64x10 <sup>10</sup>	2,45x10 <sup>10</sup>
6	1	1	1	1	1	1	1	1,11x10 <sup>10</sup>	3,64x10 <sup>10</sup>
7	1	1	-1	-1	-1	1	1	3,68x10 <sup>10</sup>	3,71x10 <sup>10</sup>
8	-1	-1	1	-1	1	1	1	2,25x10 <sup>10</sup>	1,42x10 <sup>10</sup>
9	1	-1	1	1	-1	-1	1	2,26x10 <sup>10</sup>	2,56x10 <sup>10</sup>
10	-1	-1	-1	1	-1	1	1	1,73x10 <sup>10</sup>	1,86x10 <sup>10</sup>
11	-1	-1	1	1	1	-1	-1	1,81x10 <sup>10</sup>	1,64x10 <sup>10</sup>
12	-1	1	1	-1	-1	-1	1	2,54x10 <sup>10</sup>	2,51x10 <sup>10</sup>
13	1	1	-1	1	-1	-1	-1	3,05x10 <sup>10</sup>	3,28x10 <sup>10</sup>
14	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	1,83x10 <sup>10</sup>	1,64x10 <sup>10</sup>
15	1	-1	-1	-1	1	-1	1	2,50x10 <sup>10</sup>	2,35x10 <sup>10</sup>
16	-1	1	1	1	-1	1	-1	2,75x10 <sup>10</sup>	2,59x10 <sup>10</sup>

A: extracto de levadura; B: glutamato; C: almidón; D: glucosa; E: K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·3H<sub>2</sub>O; F: MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O; G: solución de microelementos.

K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·3H<sub>2</sub>O y MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O se conservaron en el diseño, siendo la glucosa una fuente de rápida asimilación, el K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·3H<sub>2</sub>O genera un aporte de fósforo esencial en la construcción de proteínas y actividades metabólicas, y el MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O realiza un aporte principal de Mg el cual funciona como cofactor de muchas enzimas (quinasas, por ejemplo), ésteres fosfato, ribosomas y membranas (Overmann, 2006), implicado también en la actividad fijadora de nitrógeno en *A. chroococcum* (Fisher y Newton, 2002; Becking, 2006).

**Tabla 4.** Efectos principales e interacciones secundarias del diseño factorial 2<sup>7-1</sup>

Fuente	Valor - P	Efecto estimado	Suma de cuadrados	Gl	Razon - F
A: Extracto de levadura	0,000	8,101009	7,871020	1	247,94
B: Glutamato	0,000	1,021010	1,241021	1	389,95
C: Almidón	0,532	-3,251008	1,271018	1	0,4
D: Glucosa	0,053	1,031009	1,281019	1	4,04
E: K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ·3H <sub>2</sub> O	0,057	-1,021009	1,241019	1	3,91
F: MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0,501	3,501008	1,471018	1	0,46
G: Microelementos	0,002	1,711009	3,501019	1	11,03
AB + C10FG	0,155	7,501008	6,751018	1	2,13
AC + B10DG	0,047	1,071009	1,371019	1	4,3
AD + CG + EF	0,045	-1,081009	1,391019	1	4,37
A10BC + DF	0,642	-2,421008	7,011017	1	0,22
AF + BG + DE	0,077	9,421008	1,061019	1	3,35
AG + BF + CD	0,033	1,151009	1,591019	1	5
BD + CF + EG	0,847	-1,001008	1,201017	1	0,04

R<sup>2</sup>: 95,66% R<sup>2</sup> (ajustado): 93,43%

### Fase confirmatoria: método de paso ascendente

Solo cuando la región óptima ha sido identificada, un diseño de superficie de respuesta es adecuado. Aunque los resultados del diseño factorial presentaron un 95,66% de ajuste al modelo, los valores predichos de células viables no se ajustaron de una manera constante a los datos obtenidos experimentalmente, debido a estas relaciones no se puede establecer confiablemente una la zona de optimización. Con el fin de identificar la región óptima que permitiera maximizar la producción de células viables se realizaron experimentos adicionales; en este caso se emplean métodos direccionales de búsqueda como el paso ascendente y el análisis de curvatura, los cuales permiten indicar la dirección hacia la mayor respuesta.

Se seleccionó y utilizó el método de paso ascendente, el cual emplea la magnitud y signo de los efectos lineales para determinar la dirección hacia la máxima respuesta. Este método parte del centro del diseño experimental previo, se mueve y ajusta saliendo del espacio del diseño en búsqueda de una mejor respuesta, esto se logra mediante el incremento gradual de concentraciones manteniendo distancias iguales entre los pasos. De esta forma, partiendo del nivel alto del diseño factorial 2<sup>7-1</sup> se generaron incrementos equivalentes al 50% del nivel en cada paso y observando la producción de células viables (Tabla 5).

**Tabla 5** Resultados del método de paso ascendente

Paso	Fuente (g L <sup>-1</sup> )			Células viables (ufc/mL)
	Glutamato	Glucosa	Extracto Levadura	
0	0	0	0	3,72x10 <sup>9</sup> e
Δ	0,570	0,600	1,970	5,21x10 <sup>9</sup> bcd
2Δ	0,855	0,900	2,955	4,21x10 <sup>9</sup> d
3Δ	1,140	1,200	3,940	4,75x10 <sup>9</sup> cd
4Δ	1,425	1,500	4,925	6,63x10 <sup>9</sup> abc
5Δ	1,710	1,800	5,910	8,04x10 <sup>9</sup> a
6Δ	1,995	2,100	6,895	7,21x10 <sup>9</sup> bc

Las letras indican la distribución de los subgrupos por HSD-Tuckey del análisis de varianza con un 95% de confianza

Se presentaron dos puntos máximos –pasos Δ y 5Δ– dentro del método, lo que permite inferir que los dos puntos representan puntos de partida para la optimización del modelo. Sin embargo, el incremento en la producción de células viables en el paso 5Δ corresponde a un incremento 53,2% en comparación con el paso Δ, mientras el incremento en la adición de fuentes nutricionales representa un incremento del 250%, respectivamente. Debido a esta relación, el paso Δ fue seleccionado como punto central para iniciar el proceso de optimización.

**Fase de optimización: diseño de superficie de respuesta –Box Behnken**

El diseño Box Behnken es un análisis de superficie de respuesta, este tipo de diseños son ampliamente usados para estudiar el efecto de varias variables y buscar las condiciones óptimas de un sistema. Basados en el diseño factorial y el método de paso ascendente, se realizó el análisis de superficie de respuesta empleando como variables las fuentes: glucosa, glutamato monosódico y extracto de levadura. Las concentraciones se codificaron en niveles alto (+1) y bajo (-1), adicionalmente se agregaron tres puntos centrales (0) al diseño. El nivel alto corresponde a un incremento del 150% del punto central (concentraciones del paso Δ), mientras el nivel bajo fue equivalente al 50% del punto central (Tabla 6).

**Tabla 6.** Análisis de superficie de respuesta y resultados con niveles de fuentes

Fuentes nutricionales						Biomasa viable (ufc/mL)	
Codificadas			No codificadas (g L <sup>-1</sup> )			Observada	Predicha
A	B	C	A	B	C		
+1	0	-1	1,72	0,60	0,99	4,24x10 <sup>9</sup>	4,33x10 <sup>9</sup>
-1	+1	0	0,29	1,81	1,97	4,08x10 <sup>9</sup>	4,00x10 <sup>9</sup>
0	+1	-1	0,57	1,81	0,99	4,69x10 <sup>9</sup>	4,86x10 <sup>9</sup>
-1	-1	0	0,29	0,30	1,97	2,30x10 <sup>9</sup>	2,57x10 <sup>9</sup>
-1	0	-1	0,29	0,60	0,99	3,43x10 <sup>9</sup>	3,34x10 <sup>9</sup>
0	+1	+1	0,57	1,81	5,92	3,98x10 <sup>9</sup>	4,16x10 <sup>9</sup>
-1	0	+1	0,29	0,60	5,92	2,71x10 <sup>9</sup>	2,62x10 <sup>9</sup>
+1	-1	0	1,72	0,30	1,97	3,56x10 <sup>9</sup>	3,65x10 <sup>9</sup>
+1	+1	0	1,72	1,81	1,97	6,33x10 <sup>9</sup>	6,06x10 <sup>9</sup>
+1	0	+1	1,72	0,60	5,92	4,68x10 <sup>9</sup>	4,77x10 <sup>9</sup>
0	0	0	0,57	0,60	1,97	3,63x10 <sup>9</sup>	3,97x10 <sup>9</sup>
0	0	0	0,57	0,60	1,97	4,09x10 <sup>9</sup>	3,97x10 <sup>9</sup>
0	0	0	0,57	0,60	1,97	4,18x10 <sup>9</sup>	3,97x10 <sup>9</sup>
0	-1	-1	0,57	0,30	0,99	2,56x10 <sup>9</sup>	2,38x10 <sup>9</sup>
0	-1	+1	0,57	0,30	5,92	2,97x10 <sup>9</sup>	2,80x10 <sup>9</sup>

A: extracto de levadura; B: glutamato; C: glucosa.

Los valores predichos de células viables al ser comparados con los valores observados, demuestran el buen ajuste del modelo mostrando valores muy cercanos entre sí, lo cual concuerda con el porcentaje de ajuste del modelo el cual puede explicar el 90,06% de la variabilidad en la producción de las células viables, de la misma forma, el valor lack-of-fit ( $p = 0,935$ ) demostró que el modelo seleccionado es adecuado para describir los valores observados (Tabla 7).

Con base en los parámetros estimados del diseño, la ecuación 1 determina la combinación óptima de fuentes nutricionales que permiten maximizar así como predecir el comportamiento de la producción de células viables, bajo el diseño Box-Behnken:

$$Y = 3,96556 \times 10^9 + 7,87083 \times 10^8 A + 9,625 \times 10^8 B - 7,125 \times 10^7 C + 1,57639 \times 10^8 A^2 + 2,46667 \times 10^8 AB + 2,89167 \times 10^8 AC - 5,48611 \times 10^7 B^2 - 2,8 \times 10^8 BC - 3,60694 \times 10^8 C^2 \quad (1)$$

Siendo Y: biomasa viable (ufc/mL); A: nivel del extracto de levadura; B: nivel del glutamato monosódico; C: nivel de glucosa.

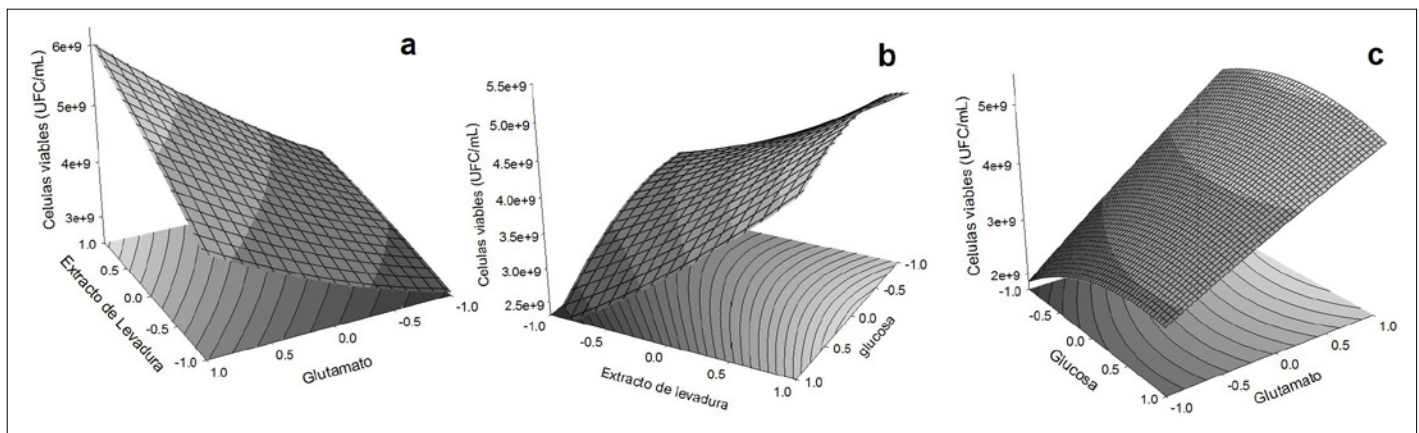
**Tabla 7.** Parámetros estimados del diseño Box-Behnken

Fuente	Suma de cuadrados	GL	Razón - F	Valor - P	Efecto estimado
A:Extracto de levadura	1,49x10 <sup>19</sup>	1	57,28	0,0003	1,57x10 <sup>9</sup>
B:Glutamato	2,22x10 <sup>19</sup>	1	85,65	0,0001	1,93x10 <sup>9</sup>
C:Glucosa	1,22x10 <sup>17</sup>	1	0,47	0,5189	-1,43x10 <sup>9</sup>
AA	2,75x10 <sup>17</sup>	1	1,06	0,3428	3,15x10 <sup>9</sup>
AB	7,30x10 <sup>17</sup>	1	2,81	0,1445	4,93x10 <sup>9</sup>
AC	1,00x10 <sup>18</sup>	1	3,87	0,0969	5,78x10 <sup>9</sup>
BB	3,33x10 <sup>16</sup>	1	0,13	0,7323	-1,10x10 <sup>9</sup>
BC	9,41x10 <sup>17</sup>	1	3,62	0,1056	-5,60x10 <sup>9</sup>
CC	1,44x10 <sup>18</sup>	1	5,55	0,0566	-7,21x10 <sup>9</sup>
Bloques	1,61x10 <sup>17</sup>	2	0,31	0,744	
Lack-of-fit	3,07x10 <sup>18</sup>	27	0,44	0,935	
Error puro	1,56x10 <sup>18</sup>	6			
Total (corr.)	4,65x10 <sup>19</sup>	44			

R<sup>2</sup>: 90,06%; R<sup>2</sup> (ajustado): 86,75%

Los parámetros estimados determinaron los niveles de óptimos de las fuentes nutricionales para maximizar la producción de células viables (Figura 1), demostrando que el glutamato monosódico y el extracto de levadura poseen un efecto ( $P \leq 0,05$ ) positivo y sinérgico sobre la producción de células viables. A pesar de ser adicionada como fuente principal de carbono, bajos niveles de glucosa fueron necesarios –en esta combinación de fuentes– basados en su interacción con otras fuentes (Figura 1b y c).

El glutamato monosódico presentó el mayor efecto primario, a pesar de haber sido adicionado como fuente de nitrógeno, su aporte de carbono a partir de su cuerpo de α-cetoglutarato el cual es metabolizado rápidamente, demostró mejores resultados en comparación con fuentes de carbono como la glucosa. El extracto de levadura fue adicionado como fuente de nitrógeno, sin embargo también realiza aportes de carbono, cofactores enzimáticos y microelementos (Edens *et al.*, 2002; Takahashi *et al.*, 2006; Ryu *et al.*, 2008), esto sumado a su interacción con el glutamato (Figura 1a) hizo evidente que el aumento en concentración de ambas fuentes es el punto central de la optimización de la producción de células viables. Esta relación de fuentes nutricionales recibió el nombre de MBR (Moreno Bonilla Rojas) presentando un valor óptimo predicho de 6,1x10<sup>9</sup> ufc/mL bajo las condiciones optimizadas.

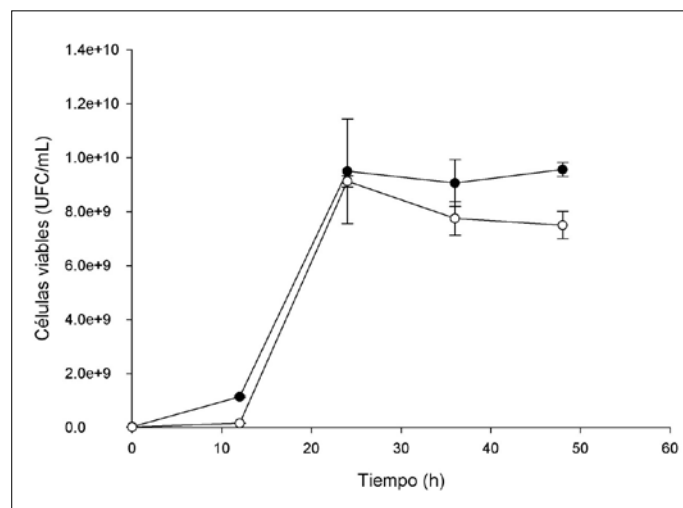


**Figura 1.** Superficies de respuesta y niveles óptimos en las interacciones de las fuentes: a) extracto de levadura y glutamato, b) extracto de levadura y glucosa, c) glucosa y glutamato.

La combinación óptima de niveles que permitió la maximización de la producción de células viables de la cepa AC1 de *Azotobacter chroococcum* fueron: extracto de levadura +1, glutamato monosódico +1, glucosa -0,0837,  $K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$  -1,  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  -1, solución de microelementos +1.

### Crecimiento y comportamiento del microorganismo

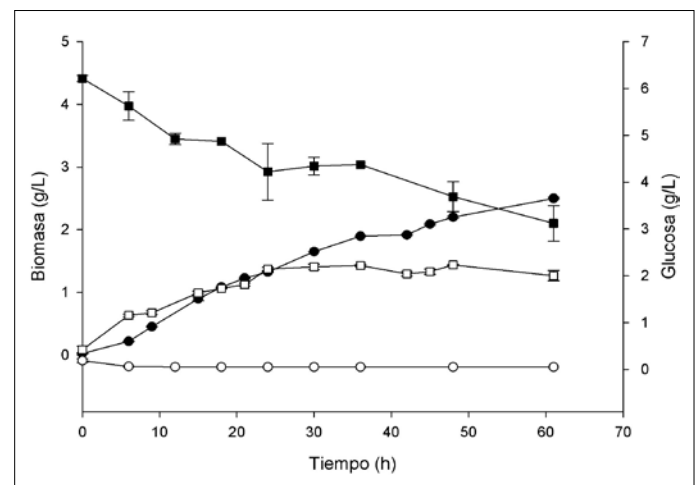
El análisis de la producción de células viables demostró exceder el valor predicho por el modelo, mostrando un comportamiento similar del microorganismo durante las primeras 24 h en ambos medios, alcanzando concentraciones de  $9 \times 10^9$  y  $1 \times 10^{10}$  ufc/mL en los medios MBR y Agrícola, respectivamente, luego de 24 h de fermentación, el microorganismo inicia su fase estacionaria en ambos medios, representada en una estabilización y disminución en la producción de células (Figura 2).



**Figura 2.** Cinética de crecimiento de biomasa viable (UFC/mL) de la cepa AC1 de *Azotobacter chroococcum* en medio Agrícola (●) y MBR (○).

En cuanto al comportamiento en la producción de biomasa ( $g L^{-1}$ ) (Figura 3), esta presentó concentraciones similares durante las primeras 24 h de fermentación en ambos medios –comportamiento similar en la producción de biomasa viable–, donde el medio MBR mantuvo estable su concentración, pasadas las 24 h de fermentación concordando con la fase estacionaria en la producción de células viables; el medio agrícola presentó un incremento constante de las 24 a las 72 h, distando de su comportamiento en la producción de biomasa viable.

Al analizar el comportamiento de la biomasa producida en el medio agrícola luego de 24 h, se observa un incremento constante cuando en comparación con la producción de células viables, esto puede atribuirse al nivel residual de azúcares reductores en el medio ( $4,3 g L^{-1}$  aprox.), ya que cuando *Azotobacter* sp., se multiplica en medios con exceso en fuentes de carbono se induce la producción de



**Figura 3.** Producción de biomasa ( $g L^{-1}$ ) en medio Agrícola (●) y MBR (□) relacionada con concentración de azúcares reductores en ambos medios: Agrícola (■) y MBR (○).

exopolisacáridos como el alginato (Peña *et al.*, 2000), estos –además de ser de elevado peso molecular– contribuyen al incremento del peso en la biomasa seca, y necesitan ser removidos mediante métodos de separación. La concentración de azúcares reductores en ambos medios durante el tiempo de crecimiento del microorganismo, es acorde con las fuentes de carbono adicionadas; en el medio MBR se presenta un rápido consumo de la glucosa, lo cual soporta el consumo de glutamato y extracto de levadura como fuentes principales en el procesos de producción de biomasa, mientras en el medio agrícola se observó la presencia en exceso de fuente de carbono luego de alcanzar su punto máximo de producción de células viables.

Adicionalmente se realizó la determinación de las actividades promotoras de crecimiento vegetal por parte del microorganismo luego de crecer en el medio MBR, se determinó su capacidad para solubilizar fósforo, realizar fijación nitrógeno y producir compuestos indólicos, lo cual demostró que las actividades biológicas de la cepa AC1 de *Azotobacter chroococcum* se conservan luego de su multiplicación bajo la combinación de fuentes nutricionales utilizada (datos no mostrados).

## CONCLUSIONES

Se estableció que la aplicación de diseños estadísticos en secuencia con un aumento paulatino en la resolución de los

mismos, demostró ser una estrategia metodológica robusta que permite la obtención de resultados con un alto nivel de confianza, permitiendo explicar el comportamiento de las variables de entrada en relación a la variable de respuesta, optimizando de esta manera el proceso.

El análisis de los diseños permitió la identificación y selección de una combinación de factores nutricionales con efecto positivo sobre la producción de biomasa viable en *Azotobacter chroococcum* AC1 con un 96.05% en comparación con el medio agrícola. La combinación de factores seleccionada permitió producir biomasa viable en tiempo y concentración, igual al requerido y obtenido con medios alternativos –medio agrícola– invirtiendo una menor cantidad de fuentes nutricionales, haciendo de estos factores identificados la base de un medio alternativo para la producción masiva de biofertilizantes basados en PGPRs del género *Azotobacter* sin afectar su actividad como promotora de crecimiento vegetal.

## Agradecimientos

Estación Experimental Motilonia – Corpoica. Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural (MADR). Cooperativa Integral Lechera del Cesar (COOLESAR). Gobernación del Cesar. Federación Colombiana de Ganaderos (FEDEGAN).

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aktas N, Boyaci IH, Mutlu M, Tanyolac A. 2006. Optimization of lactose utilization in deproteinated whey by *Kluyveromyces marxianus* using response surface methodology (RSM). *Bioresour Technol* (97):2252-2259.
- Altaf M, Naveena BJ, Reddy G. 2007. Use of inexpensive nitrogen sources and starch for L(+) lactic acid production in anaerobic submerged fermentation. *Bioresour Technol* 98(3):498-503.
- Becking JH. 2006. The Family Azotobacteraceae. *Prokaryotes* 6:759-783.
- Bonilla R, Novo R. 2001. Generación de tecnologías para la utilización de la fijación no simbiótica de nitrógeno como alternativa de fertilización. *Boletín Investigación Corpoica* 5:40.
- Bonilla RR, Pedroza AM. 2003. Aislamiento, caracterización y producción semi-industrial de *Azotobacter chroococcum* y *Azotobacter vinelandii*. *Boletín Técnico Corpoica*: 7:16.
- Doyle M, Beuchat L, Montville T. 2001. Microbiología de los Alimentos. Fundamentos y fronteras. Zaragoza, España: Ediciones Acribia.
- 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*. *Biochem Mol Actions Nutrients* 132:1141-1148.
- Fenglerowa W. 1965. Simple method for counting *Azotobacter* in soil samples. *Acta Microb Pol* 14(21):203.
- Ferrer JR, Páez G, Arenas L, Chandler C, Mármol Z, Sandoval L. 2002. Cinética de la hidrólisis ácida de bagacillo de caña de Azúcar. *Rev Fac Agron LUZ* 19(1):23-33.
- Fisher K, Newton WE. 2002. Nitrogen fixation- a general overview. En: Jeffery L, editor. *Nitrogen fixation at the millennium*. Amsterdam: Elsevier. pp. 1-34.
- Fuentes-Ramirez L, Caballero-Mellado J. 2005. Bacterial biofertilizers. En: Siddiqui ZA. editor. *PGPR: biocontrol and biofertilization*. Netherlands: Springer. pp. 143-172.
- Gao H, Gu WY. 2007. Optimization of polysaccharide and ergosterol production from *Agaricus brasiliensis* by fermentation process. *Biochem Eng J* 33(3): 202-210.
- Isar J, Agarwal L, Saran S, Saxena RK. 2006. A statistical method for enhancing the production of succinic acid from *Escherichia coli* under anaerobic conditions. *Bioresour Technol* (97):1443-1448.
- Juarez B, Martinez-Toledo MV, Gonzalez-Lopez J. 2005. Growth of *Azotobacter chroococcum* in chemically defined media containing *p*-hydroxybenzoic acid and protocatechuic acid. *Chemosphere* 59:1361-1365.
- Kennedy C, Rudnick P, Macdonald ML, Melton T. 2005. Genus III. *Azotobacter Beijerinck*. En: Brenner DJ, Krieg NR, Garrity GM, editors. *Bergey's manual of systematic bacteriology*. Vol. 2: The Proteobacteria. Part C: The Alpha-, Beta-, Delta-, and Epsilonproteobacteria. Baltimore, MD: Springer. pp. 384-402.

- Kızılkaya R. 2008. Yield response and nitrogen concentrations of spring wheat (*Triticum aestivum*) inoculated with *Azotobacter chroococcum* strains. *Ecol Eng* 33:150-156.
- Myshkina VL, Nikolaeva DA, Makhina TK, Bonartsev AP, Bonartseva GA. 2008. Effect of growth conditions on the molecular weight of poly-3-hydroxybutyrate produced by *Azotobacter chroococcum* 7B. *Appl Biochem Microbiol* 44(5):482-486.
- Overmann J. 2006. Principles of enrichment, isolation, cultivation and preservation of prokaryotes. En: *Prokaryotes*. Vol. 1. New York: Springer. pp. 80-136.
- Peña C, Trujillo-Roldán MA, Galindo E. 2000. Influence of dissolved oxygen tension and agitation speed on alginate production and its molecular weight in cultures of *Azotobacter vinelandii*. *Enzym Microb Technol* 27:390-398.
- Quagliano JC, Amarilla F, Fernandes EG, Mata D, Miyazaki SS. 2001. Effect of simple and complex carbon sources, low temperature culture and complex carbon feeding policies on poly-3-hydroxybutyric acid (PHB) content and molecular weight (*Mw*) from *Azotobacter chroococcum* 6B. *World J Microb Biotechnol* 17:9-14.
- Remus R, Ruppel S, Jacob HJ, Hecht-Buchholz Ch, Merbach W. 2000. Colonization behaviour of two enterobacterial strains on cereals. *Biol Fertil Soils* 30:550-557.
- Ren J, Lin WT, Shen YJ, Wang JF, Luo XC, Xie MQ. 2008. Optimization of fermentation media for nitrite oxidizing bacteria using sequential statistical design. *Bioresour Technol* (99):7923-7927.
- Rojas D, Garrido MF, Bonilla R. 2009. Estandarización de un medio de cultivo complejo para la multiplicación de la cepa C50 de *Rhizobium* sp. *Rev Corpoica* 10(1):70-80.
- Ryu HW, Cho KS, Goodrich PR, Park C-H. 2008. Production of polyhydroxyalkanoates by *Azotobacter vinelandii* UWD using swine wastewater: effect of supplementing glucose, yeast extract, and inorganic salts. *Biotechnol Bioproc Eng* (13):651-658.
- Takahashi T, Fei YZS, 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. *Adv Access Publ* 3(1):109-115.
- Xu F, Tao WY, Cheng L, Guo LJ. 2006. Strain improvement and optimization of the media of taxol-producing fungus *Fusarium maire*. *Biochem Eng J* 31:67-73.