



TECNOLÓGICO NACIONAL DE MÉXICO  
Instituto Tecnológico El Llano Aguascalientes



División de Estudios de Posgrado e Investigación  
Maestría en Ciencias en Biotecnología Agropecuaria

**Optimización de factores que influyen la producción masiva de  
(*Bacillus subtilis*) en biorreactor tipo *Airlift***

Tesis que presenta:

**Leonardo González Delgadillo**

Como requisito parcial para obtener el grado de:

**Maestro en Ciencias en Biotecnología Agropecuaria**



El Llano Aguascalientes, México, agosto de 2022

## DICTAMEN DE TESIS APROBADA



Instituto Tecnológico El Llano Aguascalientes  
División de Estudios de Posgrado e Investigación

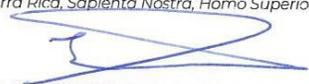
### DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO E INVESTIGACIÓN DICTAMEN DE TESIS APROBADA

El Llano, Aguascalientes, **12/agosto/2022**

El Comité de Tesis del Candidato a grado **C. LEONARDO GONZÁLEZ DELGADILLO**, aprobado por el Consejo de Posgrado de la División de Estudios de Posgrado e Investigación del Instituto Tecnológico El Llano Aguascalientes; integrado por los **C. DR. LUIS LORENZO VALERA MONTERO, DRA. SILVIA FLORES BENÍTEZ, DR. CATARINO PERALES SEGOVIA**, habiéndose reunido a fin de evaluar el trabajo final de la tesis titulada: **"Optimización de factores que influyen en la producción masiva de *Bacillus subtilis* en biorreactor tipo airlift"**, que presenta como requisito parcial para obtener el Grado de Maestro en Ciencias en Biotecnología Agropecuaria, según lo establecen los Lineamientos para la Operación de los Estudios de Posgrado del TecNM, y de acuerdo a las Bases para la Elaboración de Tesis de Posgrado, dictaminaron su **APROBACIÓN** para que pueda ser presentada en el Examen de Grado correspondiente.

#### ATENTAMENTE

*Excelencia en Educación Tecnológica®  
Terra Rica, Sapientia Nostra, Homo Superior Est*

  
DR. LUIS LORENZO VALERA MONTERO  
DIRECTOR DE TESIS

  
DRA. SILVIA FLORES BENÍTEZ  
ASESORA

  
DR. CATARINO PERALES SEGOVIA  
ASESOR

C.c.p.- Consejo de posgrado.  
C.c.p.- Archivo.



Km. 18 Carretera Ags. - S.L.P., El Llano Aguascalientes, C.P. 20330 Tel. (449) 362 - 11 - 00 ext. 212 e-mail: e-mail: depi\_ellano@tecnm.mx tecnm.mx | llano.tecnm.mx



## CESIÓN DE DERECHOS

### CARTA DE CESIÓN DE DERECHOS

En la Ciudad de El Llano, Aguascalientes el día 08 de agosto del año 2022, el que suscribe, C. Leonardo González Delgadillo, alumno del Programa de Maestría en Ciencias en Biotecnología Agropecuaria con número de control M19900249, adscrito al Tecnológico Nacional de México/Instituto Tecnológico El Llano Aguascalientes, manifiesta ser autor del presente trabajo de Tesis bajo la dirección de la Dr. Luis Lorenzo Valera Montero, y cede los derechos del trabajo intitulado "*Optimización de factores que influyen la producción masiva de (Bacillus subtilis) en biorreactor tipo airlift*" y de patentes y beneficios que puedan originarse del presente, al Tecnológico Nacional de México/Instituto Tecnológico El Llano Aguascalientes,

ATENTAMENTE

Leonardo Gonzalez

Leonardo González Delgadillo

## **AGRADECIMIENTOS**

Al CONACyT por el apoyo económico para la realización de mis estudios de posgrado.

Al Instituto Tecnológico El Llano Aguascalientes, por permitir usar sus instalaciones, aulas y laboratorio de producción de microorganismos.

Al Dr. Luis Lorenzo Valera Montero por sus enseñanzas, su apoyo y su paciencia.

A la Dr. Silvia Flores Benítez por sus consejos, apoyo y asesoramiento en este trabajo.

Al Dr. Catarino Perales Segovia por su conocimiento y su asesoramiento en este trabajo.

## DEDICATORIAS

A mi padre, Leonardo González Ávila, en paz descanse, por enseñarme a trabajar, jamás rendirse y a luchar ferozmente por lo que se quiere.

A mi hermano Oswaldo González Delgadillo, descanse en paz por enseñarme a ser tenaz ante cada situación.

Al tío Ing. Abel Zumaya Guzmán en paz descanse, por alentarme siempre a seguir estudiando, compartir un poco de su sabiduría y animarme a trabajar más.

A Martín Guerrero Medina, en paz descanse, por enseñarme lo que es la responsabilidad y el compromiso con el trabajo.

A mi esposa e hija que son lo mejor de mi vida.

## RESUMEN

La problemática del control de las enfermedades de los cultivos con productos de síntesis química está causando la contaminación de los suelos, cuando se usan directamente en ellos, haciéndolos infértiles, debiendo usar cada vez más estos productos. Es por eso por lo que, desde hace varios años se están utilizando opciones amigables con el medio ambiente como lo son el uso de microorganismos que controlan dichas enfermedades.

En este trabajo se utilizó la bacteria *Bacillus subtilis*, la cual además de controlar enfermedades que atacan las raíces, tiene un efecto positivo en las plantas.

Se realizaron varias pruebas para hacer el caldo de cultivo con fertilizantes de uso común como lo son el sulfato de amonio como fuente de nitrógeno, el Ultra-K como fuente de potasio, el super fosfato de calcio triple y como inóculo se usó el Serenade®, para satisfacer los requerimientos de *Bacillus subtilis* en el medio de cultivo, además de usar un biorreactor tipo *Airlift* hecho a mano. También se usaron como fuente de carbono, productos de la caña de azúcar, como lo son el azúcar y la melaza.

En algunos experimentos, se obtuvieron concentraciones de hasta  $10 \times 10^{11}$  UFC/ml a las 11 horas de fermentación. Los componentes que más afectaron positivamente el crecimiento bacteriano fueron, el azúcar y la melaza, además del super fosfato de calcio triple. En el caso de la azúcar, la cantidad más alta fue la que promovió que las bacterias se reprodujeran y crecieran a mayor medida, en el caso de la melaza la cantidad media tuvo el mismo efecto que el azúcar en su

cantidad más alta. En el caso del superfosfato de calcio triple, el nivel bajo en combinación con el nivel alto de azúcar fueron los que produjeron la mayor cantidad de bacterias. La melaza en el nivel medio y el superfosfato también en el nivel medio, además del sulfato de amonio en el nivel medio fueron los que más aumentaron la turbidez.

## ABSTRACT

Controlling diseases of crops with products of chemical synthesis is causing the contamination of soils, when they are used directly on them, making them infertile, and these products must be used more and more. That is why, for several years, environmentally friendly options such as the use of microorganisms that control these diseases have been used.

In this work, the bacterium *Bacillus subtilis* was used, which in addition to controlling root diseases, has a positive effect on plants.

Several tests were carried out with commonly used fertilizers such as ammonium sulfate as a nitrogen source, Ultra-K as a source of potassium, monocalcium phosphate and Serenade® was used as an inoculum, to meet the needs of *Bacillus subtilis* in the culture medium, in addition to using a hand-made Airlift type bioreactor. Sugarcane products, such as sugar and molasses, were also used as a carbon source.

In some experiments, concentrations of up to  $10 \times 10^{11}$  UFC/ml were obtained at 11 hours of fermentation. The components that most positively affected bacterial growth were sugar and molasses, in addition to monocalcium phosphate. In the case of sugar, the highest level caused bacteria to reproduce and grow to the greatest extent, in the case of molasses, the medium amount had the same effect as the highest amount of sugar. The lowest level of monocalcium phosphate in combination with the highest sugar level produced the maximum growth of bacteria. Molasses in the medium level and the monocalcium phosphate also in the medium level, in addition to the ammonium sulfate in the medium level, was the combination that increased the highest turbidity.

## **SIMBOLOS Y NOMENCLATURAS**

BAL	Biorreactor Airlift
PGPR	Plant Growth Promoting Bacteria
DAP	Fosfato Diamónico
UFC	Unidades Formadoras de Colonias
CN	Caldo Nutritivo
DO	Densidad Óptica
MM	Médio de Cultivo Mínimo

## ÍNDICE GENERAL

	Página
DICTAMEN DE TESIS APROBADA	II
CESIÓN DE DERECHOS	III
AGRADECIMIENTOS	IV
DEDICATORIAS	V
RESUMEN	VI
ABSTRACT	VII
SIMBOLOS Y NOMENCLATURAS	VIII
ÍNDICE GENERAL	IX
ÍNDICE DE CUADROS	X
ÍNDICE DE FIGURAS	XI
<b>I INTRODUCCIÓN</b>	1
<b>II OBJETIVOS</b>	3
2.1 Objetivo general	3
2.2 objetivos específicos	3
<b>III HIPÓTESIS</b>	4
<b>IV REVISIÓN DE LITERATURA</b>	5
4.1 Antecedentes de biorreactores	5
4.1.1 Procesos fermentativos: producción de bebidas alcohólicas	5
4.1.2 Procesos fermentativos: producción de antibióticos	6
4.2 Clasificación de los biorreactores	8
4.2.1 Biorreactor discontinuo	8
4.2.2 Biorreactor semicontinuo o lotes alimentados	9
4.2.3 Biorreactor continuo	10
4.3 Antecedentes de <i>Bacillus subtilis</i>	10
4.4 Bacterias promotoras del crecimiento vegetal	11
4.5 Características de <i>Bacillus subtilis</i>	12
4.6 Mecanismos de acción de <i>Bacillus subtilis</i>	12

4.7 Clasificación taxonómica de <i>Bacillus subtilis</i>	12
4.8 Morfología de <i>Bacillus subtilis</i>	14
4.9 Análisis de materia seca para composición de bacterias	14
4.10 Casos exitosos de producción de <i>Bacillus subtilis</i> en biorreactores	15
4.11 <i>Bacillus subtilis</i> como agente de control biológico	22
<b>V MATERIALES Y MÉTODOS</b>	<b>23</b>
5.1 Descripción del laboratorio	23
5.2 Medios de cultivo de bajo costo	24
5.3 Métodos Estadísticos	24
5.3.1 Experimento 1	24
5.3.2 Experimento 2	26
5.3.3 Experimento 3	27
5.3.4 Experimento 4	27
<b>VI RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b>	<b>29</b>
6.1 Primer experimento	29
6.1.1 Oxígeno disuelto	29
6.1.2 Turbidez	32
6.1.3 pH	36
6.1.4 Temperatura	38
6.2 Experimento 2	41
6.2.1 Oxígeno disuelto	44
6.2.2 Turbidez	47
6.2.3 pH	50
6.2.4 Temperatura	51
6.3 Experimento 3	52
6.3.1 Oxígeno disuelto	52
6.3.2 Turbidez	55
6.3.3 pH	58
6.3.4 Temperatura	60
6.4 Experimento 4	61

6.4.1 Oxígeno Disuelto	61
6.4.2 Turbidez	
6.4.3 pH	
6.4.4 Temperatura	
<b>VII CONCLUSIONES</b>	<b>63</b>
<b>VIII LITERATURA CITADA</b>	<b>64</b>

## ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro		Página
1	Clasificación taxonómica de <i>Bacillus subtilis</i>	13
2	Requerimientos de nutrientes por gramo de materia seca. Cantidades de nutrientes usados en este experimento	13
3	Componentes de los medios de cultivo	24
4	Niveles de los componentes del medio de cultivo e inóculo para 50 litros.	25
5	Composición del medio de cultivo para cada corrida del experimento 1	25
6	Composición del medio de cultivo de cada corrida del experimento 2	27
7	Composición del medio de cultivo de cada corrida del experimento 3	27
8	Composición del medio de cultivo de cada corrida del experimento 4	28
9	Resultados del oxígeno disuelto en cada corrida durante 12 horas, cada hora	29
10	ANOVA del parámetro de oxígeno disuelto	30
11	ANOVA de relaciones de señal/ruido para oxígeno disuelto	33
12	Resultados de turbidez del primer experimento	36
13	ANOVA del parámetro de turbidez del primer experimento	37
14	ANOVA de relaciones de señal/ruido de la turbidez del primer experimento	39
15	Recomendación de la fórmula del primer experimento	40
16	Resultados de pH para el primer experimento	40
17	Medias del pH del primer experimento	41
18	Resultados de temperatura del primer experimento	43

19	Medias de la temperatura del primer experimento	44
20	ANOVA de relaciones de señal/ruido para temperatura	47
21	Resultados del oxígeno disuelto en cada corrida durante 24 horas, cada hora	47
22	ANOVA de medias del oxígeno disuelto del experimento 2	49
23	ANOVA de relaciones de señal/ruido del oxígeno disuelto del experimento 2	50
24	Resultados de turbidez del experimento 2	51
25	ANOVA de medias de la turbidez del experimento 2	53
26	ANOVA de relaciones de señal/ruido de la turbidez del experimento 2	54
27	Recomendación de la fórmula del experimento 2	55
28	Resultados de las mediciones de pH en el experimento 2	56
29	Resultados de temperatura del experimento 2	58
30	Resultado del oxígeno disuelto del experimento 3	60
31	ANOVA de medias del oxígeno disuelto del experimento 3	61
32	ANOVA de relaciones de señal/ruido del oxígeno disuelto del experimento 3	63
33	Resultados de la turbidez del experimento 3	65
34	ANOVA de medias de la turbidez del experimento 3	65
35	ANOVA de relaciones de señal/ruido de la turbidez del experimento 3	67
36	Recomendación de la fórmula del experimento 3.	68
37	Resultados del pH del experimento 3	69
38	ANOVA de medias del oxígeno disuelto del experimento 3	69
39	ANOVA de relaciones de señal/ruido del pH del experimento 3	71
40	Resultados de la temperatura del experimento 3	72
41	Resultados del oxígeno disuelto del experimento 4.	74
42	ANOVA de medias del oxígeno disuelto del experimento 4	76
43	ANOVA de relaciones de señal/ruido del oxígeno disuelto del	78

	experimento 4	
44	Resultados de la turbidez del experimento 4	79
45	ANOVA de medias de la turbidez del experimento 4	81
46	ANOVA de relaciones señal/ruido de la turbidez del experimento 4	83
47	Recomendación de la fórmula del experimento 4	84
48	Resultados del pH del experimento 4	85
49	Medias del pH del experimento 4	86
50	Resultados de temperatura del experimento 4	88
51	Medias de la temperatura del experimento 4	89

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura		Página
1	Diagrama de un biorreactor discontinuo	9
2	Diagrama de un biorreactor semicontinuo o por lotes alimentados	10
3	Diagrama de un biorreactor continuo	10
4	Ciclo de vida de <i>Bacillus subtilis</i>	13
5	Morfología de <i>Bacillus subtilis</i>	14
6	Laboratorio de producción de microorganismos benéficos	23
7	Comportamiento del oxígeno disuelto del primer experimento	30
8	ANOVA de medias del oxígeno disuelto del primer experimento	31
9	ANOVA de relaciones de señal/ruido del oxígeno disuelto del primer experimento	33
10	Comportamiento de la turbidez del experimento 1	35
11	ANOVA de medias de la influencia de la turbidez	38
12	ANOVA de relaciones de señal/ruido del oxígeno del primer experimento	38
13	ANOVA de medias del pH del primer experimento	42
14	ANOVA de medias de la temperatura del primer experimento	45
15	ANOVA de relaciones de señal/ruido de la temperatura del primer experimento	46
16	Comportamiento del oxígeno disuelto del experimento 2	48
17	ANOVA de medias del oxígeno disuelto del experimento 2	49

18	ANOVA de medias de relaciones de señal/ruido del oxígeno disuelto del experimento 2	50
19	Comportamiento de la turbidez del experimento 2	52
20	ANOVA de medias de la turbidez del experimento 2	53
21	ANOVA de relaciones de señal/ruido de la turbidez del experimento 2	54
22	ANOVA de medias del pH del experimento 2	57
23	ANOVA de medias de la temperatura del experimento 2	59
24	Comportamiento del oxígeno disuelto del experimento 3	61
25	ANOVA de medias del oxígeno disuelto del experimento 3	62
26	ANOVA de relaciones de señal/ruido del oxígeno disuelto del experimento 3	63
27	Comportamiento de la turbidez del experimento 3	64
28	ANOVA de medias de la turbidez del experimento 3	66
29	ANOVA de relaciones de señal/ruido de la turbidez del experimento 3	67
30	ANOVA de medias del pH del experimento 3	70
31	ANOVA de relaciones de señal/ruido del pH del experimento 3	70
32	ANOVA de relaciones de señal/ruido de la temperatura del experimento 3	72
33	Comportamiento del oxígeno disuelto del experimento 4	75

34	ANOVA de medias del oxígeno disuelto del experimento 4	77
35	ANOVA de relaciones señal/ruido del oxígeno disuelto del experimento 4	77
36	Comportamiento de la turbidez del experimento 4	80
37	ANOVA de medias de la turbidez del experimento 4	81
38	ANOVA de relaciones señal/ruido de la turbidez del experimento 4	82
39	ANOVA de medias del pH del experimento 4	87
40	ANOVA de medias de la influencia de la temperatura del experimento 4	90

## I. INTRODUCCIÓN

Actualmente la agricultura está en una situación poco favorable en la cual han resultado una serie de problemas de contaminación de suelos y aguas; esto debido al uso irresponsable de productos químicos, en específico de herbicidas, fungicidas y fertilizantes de síntesis química, dando como resultado de compactación de suelo, contaminación de mantos freáticos por percolación, resistencia de plagas y enfermedades, así como la muerte en grandes cantidades de abejas por el uso de insecticidas. Por consecuencia, se está tomando la iniciativa desde varios años de prohibir algunos productos que resultan más persistentes en el ambiente. En algunos casos, algunos agricultores están optando por erradicar definitivamente el uso de químicos y adoptar la llamada agricultura orgánica o sustentable.

La agricultura sustentable engloba una serie de prácticas, procesos y productos, específicamente, usar abonos con alto contenido de materia orgánica, los cuales se pueden obtener con un proceso de composteo de residuos orgánicos que pueden ser las sobras de restaurantes, vegetales pasados de su punto de consumo, estiércoles, algunos residuos industriales, lodos, incluso vestigios de la industria cárnica como pueden ser: huesos, sangre y cuero, claramente con un proceso de fermentación o molienda. Asimismo, el uso de los residuos de cosechas anteriores, son una excelente opción para remediar o evitar la compactación de los suelos, además de funcionar con cubiertas, las cuales evitan la emergencia de malezas por medio de la sombra, y así evitar el uso de herbicida

En cuanto al control de plagas existe la tendencia al uso de extractos vegetales y aceites esenciales que funcionan muy bien como repelentes, atrayentes y con acción insecticida o acaricida, un ejemplo, es el extracto de ajo, que funciona excelente para el control de ácaros y pulgones, el extracto de chile, canela y chicalote, que tienen acción irritante. Se conoce también con efecto nematicida el extracto de gobernadora, para el control de nematodos, así como extracto de higuierilla. Para el caso de las enfermedades existen también muchos métodos de control, también se incluyen algunos extractos botánicos, como extracto del árbol del té, extracto de *Reynoutria spp* para control de hongos. También la adición de azufre, sulfato de cobre y agua oxigenada. En el caso de hongos benéficos, son conocidos los microorganismos como *Trichoderma* y *Pseudomonas* por su capacidad de control de las enfermedades de raíz y aéreas como lo son: moho gris, mildiús, antracnosis y tizones entre otros.

En este proyecto se trabajó con la rizobacteria *Bacillus subtilis* que, además de su conocida capacidad de controlar enfermedades por medio de competencia por espacio o por la secreción de algunos antibióticos, tiene efecto bio-estimulante en las plantas, que también secreta sustancias enraizantes y solubilización de fósforo en el suelo. Se evaluará la capacidad de reproducción de un biorreactor con un sistema de agitado *Airlift*, que consiste en cuatro tubos colocados en diagonal con salidas para aire. También se medirán las condiciones de temperatura, pH, oxígeno disuelto y turbidez; además de un cultivo de *Bacillus* para ver que no se haya contaminado con otros microorganismos no deseados.

## II. OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo General

Determinar las condiciones óptimas para la reproducción masiva de *Bacillus subtilis*.

### 2.2 Objetivos Específicos

- Evaluar diferentes medios de cultivo en relación con la producción de crecimiento bacteriano.
- Monitorear el oxígeno disuelto, turbidez, pH y temperatura en los medios de cultivo durante el crecimiento de la población bacteriana.

### III. HIPÓTESIS

La utilización de fertilizantes de uso común y productos de caña de azúcar, satisfacen las necesidades de nutrimentos para la reproducción masiva de *Bacillus subtilis*.

## IV. REVISIÓN DE LITERATURA

### 4.1 Antecedentes de biorreactores

Cultivar células microbianas fuera de su ambiente natural, como es el caso de los cultivos en biorreactores (o fermentadores), implica conocer y proveer las condiciones favorables para su crecimiento y para la generación de productos celulares de interés. Es decir, el desarrollo de un proceso fermentativo requiere necesariamente del aprendizaje de cómo proveer los estímulos necesarios para que las células actúen en nuestro beneficio, lo que podría denominarse una “domesticación” de ellas [1].

#### 4.1.1 Procesos fermentativos: producción de bebidas alcohólicas

Durante los periodos egipcio, griego y romano tuvieron un avance en cultivo de la vid, así como en la producción de cerámica y pequeñas innovaciones en la fermentación de vinos. Alcanzaron su punto máximo alrededor de 200 a 400 a.c. y fue seguido por un periodo de 1200 a 1400 años durante cuyo progreso en la tecnología del vino se desaceleró y generalmente se restringió a las órdenes de religiosas monásticas en Europa occidental. Los métodos comenzaron a acelerarse en el siglo XVIII debido a que el comercio comenzó a expandirse a otras partes del mundo y a si la demanda de dicho producto con las características específicas como el sabor y la textura en la boca. [2].

Con el rápido avance de la ciencia en Europa, era natural que el vino se convertiría en un tema de investigación para muchos científicos. Un primer ejemplo

de investigación fenólica fue la de Pasteur, quien reconoció que el oxígeno jugó un papel importante en el desarrollo del vino tinto en general y color en particular [3].

Pasteur fue el primero en demostrar experimentalmente que las bebidas fermentadas son el resultado de la acción de la levadura que transforma la glucosa en etanol. Por otra parte, demostró que solo los microorganismos son capaces de convertir azúcares en alcohol del jugo de la uva, y que este proceso ocurre en la ausencia de oxígeno. Llegó a la conclusión de que la fermentación es vital para el proceso, y lo definió como fermentación anaerobia [4].

En el caso de otros alimentos como la cerveza y el pan fueron los primeros casos en el uso de levaduras, que deben reproducirse en condiciones muy específicas según su finalidad. *Saccharomyces cerevisiae* es uno de los organismos más usados en la fermentación, en este caso, para la producción de cerveza, aunque no se tuviera en un principio, conciencia de la participación del microorganismo en la elaboración de dichos alimentos [5].

La especie de levadura que domina en la producción de bebidas alcohólicas en todo el mundo es *Saccharomyces cerevisiae* y las cepas particulares de esta especie empleadas en la fermentación ejercen una profunda influencia en las características de sabor y aroma de diferentes bebidas. Para gran escala de fermentaciones de bebidas, como la elaboración de cerveza, vinificación y producción de destilados, cultivos puros, se usan cepas seleccionadas de *S. cerevisiae*. Estas cepas se obtienen en casa o se suministran de empresas productoras de levadura. En procesos de menor escala (artesanales) o en fermentaciones espontáneas, se puede permitir que se produzca con base en la flora microbiológica endémica, (levaduras y bacterias silvestres) presentes en la materia prima y en las instalaciones de producción.

Por ejemplo, esto sería típico en pequeñas destilerías en México (para la producción de tequila o mezcal) y en Brasil (para la producción de *Cachaça*). En algunos tipos de fermentaciones de bebidas alcohólicas, las levaduras *S. cerevisiae* pueden emplearse como cultivos iniciadores. Por ejemplo, en la vinificación se utilizó la cepa de levadura *S. cerevisiae* para comenzar la fermentación y al cabo del tiempo, puede ser invadida por la flora que las mismas uvas llevan [6].

#### 4.1.2 Procesos fermentativos: producción de antibióticos

Al comienzo de la segunda guerra mundial, Alexander Fleming acaparó la atención de los científicos de esos años debido a que, a partir del moho causado por el hongo *Penicillium spp* notó que inhibía el crecimiento de algunas bacterias en sus experimentos de laboratorio. El producto comercial se llama penicilina.

A pesar de que existía el producto para el control de algunas bacterias, fue hasta el año de 1941, cuando algunos investigadores de Oxford visitaron a Fleming e hicieron experimentos en humanos, arrojando unos resultados excepcionales en el manejo de enfermedades bacterianas en humanos, con fermentadores improvisados y las cepas más productivas hasta el momento, científicos, grandes empresas a nivel industrial y académicos, comenzaron una gran cadena de producción para llevar grandes cantidades de penicilina de grado comercial a los soldados [7].

En 1932 la penicilina entro en una serie de nuevas pruebas, las cuales se centraron en la producción de compuestos orgánicos por fermentación, esto después de otra investigación sobre la fermentación de acetona-butanol y la investigación de glicerol. Ahí habían desarrollado la fermentación a alta temperatura

(65°C) de pulpa de celulosa con la que producían metano. Descubrieron que a una temperatura alta eran muchos los metabolitos secundarios que se podían producir en los fermentadores [8].

Los biorreactores de tanque agitado para la experimentación surgieron (hace más de medio siglo) con el propósito de lidiar con muchas de estas limitaciones y se han ido perfeccionando en busca del control más preciso de los ambientes de desarrollo de cultivos vivos, estableciéndose como un estándar en la industria biotecnológica. El empleo de sensores en el interior del vaso, conectados a dispositivos de control automático, permite mantener los valores de temperatura, pH, oxígeno disuelto y otros parámetros de interés, dentro de los límites estrechos necesarios para el éxito de las fermentaciones. Por otro lado, el empleo de sistemas eficientes de aireación y agitación garantiza niveles óptimos en la transferencia de oxígeno y en el mezclado.

Dentro de estos, los biorreactores de pequeña escala han resultado vitales en procesos de escalado y des-escalado, optimización de cepas, caracterización y desarrollo de procesos. Existe una interesante diversidad de biorreactores comerciales con elevados estándares de calidad; sin embargo, el elevado precio de venta que persiste aún en los diseños más económicos representa una inobjetable limitante. Importantes firmas comercializadoras, como Infors HT® (Suiza), ofertan estos equipos en precios que rondan entre los € 20,000 y € 75,000 en biorreactores de tanque agitado de pequeña escala (Minifors®) y escala piloto (Techfors-S®), respectivamente. Estos precios dificultan de forma considerable su adquisición en países en vías de desarrollo y, especialmente, en instituciones científicas y académicas dentro de estos [7].

Los biorreactores airlift (BAL) son ampliamente usados en bioprocesos. En el diseño de un BAL se consideran las relaciones geométricas entre la altura del

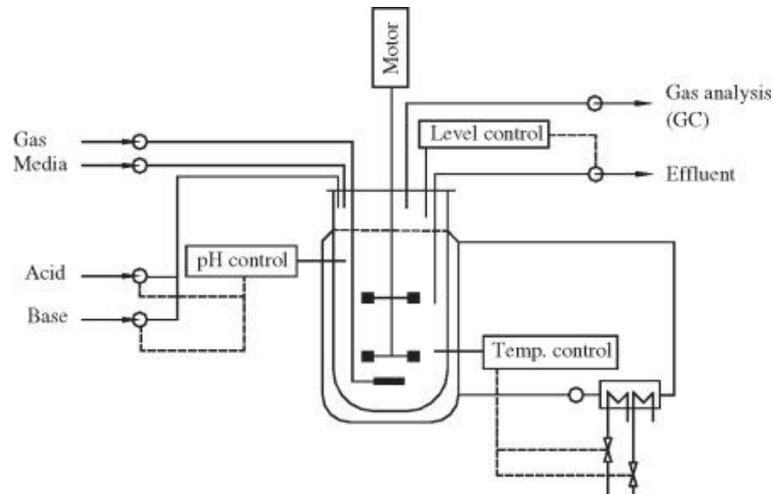
tubo concéntrico, la altura de operación del líquido, diámetro del tubo concéntrico, diámetro del BAL y su efecto sobre la hidrodinámica [8].

## 4.2 Clasificación de biorreactores

Existen tres modos de operación de un biorreactor caracterizados principalmente por cómo se alimenta el tanque: modo discontinuo (o batch), como semi-continuo (o feed-batch) y modo continuo [9].

### 4.2.1 Biorreactor discontinuo

Este tipo de biorreactor es el más antiguo, y que más se utiliza en la industria biotecnológica, debido a que es el modelo que se usa para la elaboración de bebidas alcohólicas y pan. En estos biorreactores, se combinan todos los ingredientes y después del proceso de fermentación, se obtiene el producto a la concentración necesaria. Este proceso en este modelo es relativamente barato, así mismo la concentración del producto final, puede ir en función del tiempo de fermentación dentro de éste. Los microorganismos usados en este modelo son adicionados en el medio a baja temperatura, la cual es incontrolable hasta que termine el proceso. Normalmente el ciclo termina cuando se alcanza la concentración deseada [10].

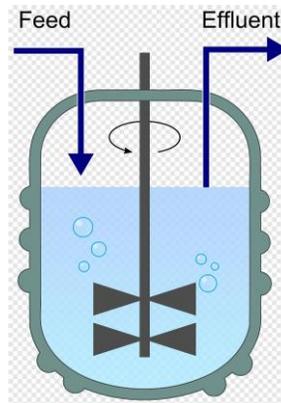


**Figura 1. Diagrama de un biorreactor discontinuo [10].**

Este modelo simula una parte del tracto intestinal, así como los tiempos de fermentación, que van de 2-24 horas. La alteración del medio de cultivo debido a el consumo de los nutrimentos y la generación de gases pueden afectar y modificar el producto final que son los microorganismos, es por eso por lo que se deben usar modelos ya probados o hacer las mediciones correspondientes [11].

#### 4.2.2 Biorreactor semicontinuo o lotes alimentados

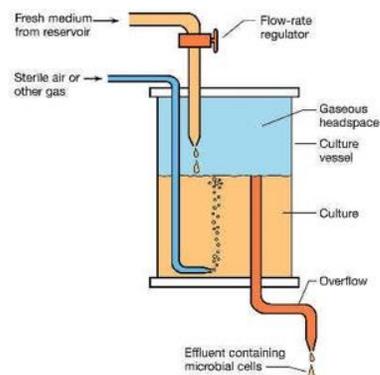
En este modelo, los nutrientes son suministrados de manera continua o semicontinua, mientras que no hay efluente en el sistema o que no sale producto al mismo tiempo en el que entran los nutrientes. Según la finalidad del biorreactor, se puede adicionar los nutrientes de manera gradual, esto mejora la fermentación siempre y cuando se mantenga una baja concentración del sustrato [9].



**Figura 2. Diagrama de un biorreactor semicontinuo o por lotes alimentados.**

#### 4.2.3 Biorreactor continuo

Consiste en la alimentación constante del biorreactor, suministrando los nutrientes y a la vez retirando producto final, es por esto por lo que se llama continuo, aunque se tiene que comenzar como un reactor discontinuo, debido a que primero se debe tener la concentración de microorganismos para poder comenzar con el flujo continuo de sustrato-producto final [12].



**Figura 3. Diagrama de un biorreactor continuo.**

#### 4.3 Antecedentes de *Bacillus subtilis*

La producción de microorganismos utilizados como agentes de biorremediación de suelos contaminados fue por Winogradsky con sus colaboradores en el siglo XIX, ya que observaron que estos, tenían la capacidad de metabolizar compuestos tóxicos para la microbiología del suelo, así como a la fertilidad de este, logrando así que las moléculas simplificadas pudieran ser absorbidas por las plantas.

La fijación del nitrógeno, estudiada desde hace más de 100 años. En 1901, Beijerinck reportó la interacción de microorganismos como *Azospirillum*, *Azotobacter*, *Bacillus*, *Clostridium* y *Klebsiella*, que lo fijan por asociación y algunos que forman simbiosis como *Rhizobium* y *Bradyrhizobium* [13].

#### 4.4 Bacterias promotoras de crecimiento bacteriano

En 1978 se nombró a las bacterias que habitaban la raíz de las plantas que influían a favor del desarrollo de las plantas, como (*PGPR*) *Plant Growth Promoting Rhizobacteria*. Dichas bacterias tienen la capacidad de aumentar el rendimiento de las plantas, esto por la simbiosis que se genera entre las plantas y las bacterias, estas se alimentan de los exudados de la raíz, entonces al colonizar, generan compuestos como fitohormonas, además de otros compuestos que solubilizan los nutrientes presentes en la rizósfera; también compiten por espacio con microorganismos dañinos, así como la producción de antibióticos y sustancias líticas que afectan las paredes celulares de algunos hongos fitopatógenos. Existen varios géneros dentro de las bacterias promotoras del crecimiento, pero las siguientes son las más estudiadas: *Agrobacterium*, *Azospirillum*, *Azotobacter* y *Bacillus* [14].

#### 4.5 Características de *Bacillus subtilis*

Las bacterias de este género tienen la forma característica de barra con las orillas redondeadas, miden 2 micras de largo y 1 de ancho. Donde, al verlas bajo microscopio se puede observar una espora, que no cambia la forma de la bacteria ya que es de un tamaño pequeño. Y en la formación de las colonias, se puede ver que su coloración es blanquecina o en función del medio en el que se desarrolle [15].

#### 4.6 Mecanismos de acción de *Bacillus subtilis*

Estas propiedades, asociadas a la habilidad de producir antibióticos peptídicos, contribuyen a su utilización para el biocontrol de varias enfermedades radiculares y foliares. *Bacillus subtilis* controla las bacterias que causan la enfermedad en la planta a través de una variedad de mecanismos de acción, como competencia, resistencia sistémica inducción y producción de antibióticos. Se ha demostrado que el mecanismo de antibiosis es uno de los más importantes. Entre varios antibióticos peptídicos, ellos producen lipopéptidos, que son anfifílicos compuestos con actividad tensioactiva [16]. El conocimiento de los ya mencionados mecanismos de acción ha permitido el uso de *Bacillus subtilis* como un gran aliado contra las enfermedades de raíz de los cultivos, así como algunas enfermedades foliares [17].

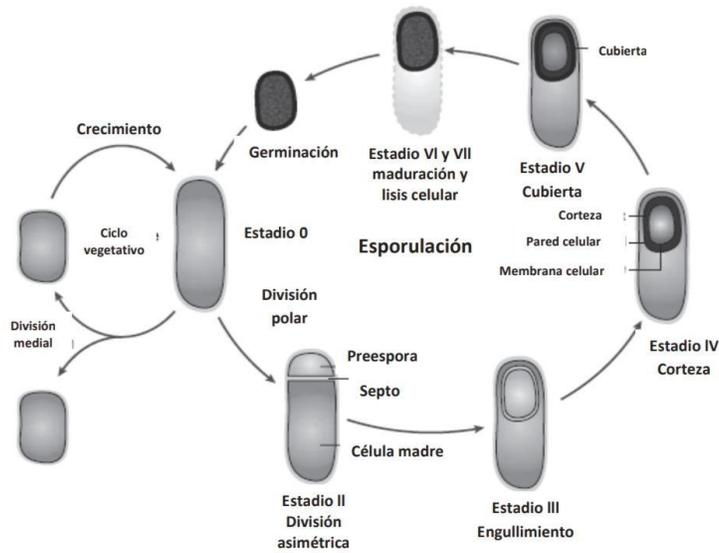
#### 4.7 Clasificación taxonómica de *Bacillus subtilis*.

Es una bacteria Gram+, mesófila, con esporas de pared delgada, de forma cilíndrica, fermentativa, así como la capacidad de hidrolizar la caseína y el almidón. Clasificada también como aerobia (Cuadro 1).

**Cuadro 1. Clasificación taxonómica de *Bacillus subtilis* [18].**

Reino:	Bacteria
Filo:	<i>Firmicutes</i>
Clase:	<i>Bacilli</i>
Orden:	<i>Bacillales</i>
Familia:	<i>Bacillaceace</i>
Genero:	<i>Bacillus</i>
Especie:	<i>Bacillus subtilis</i>

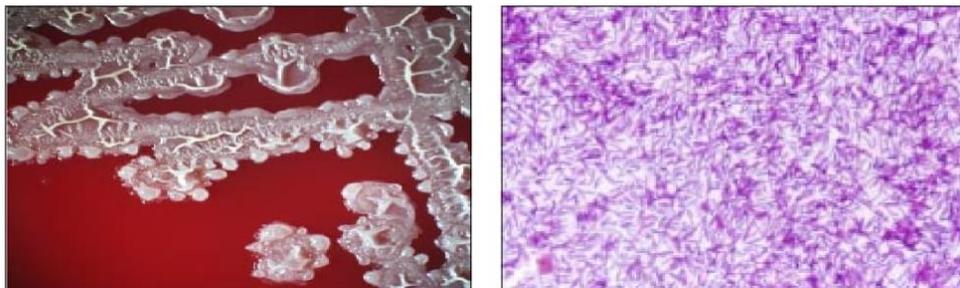
En la figura 4 se muestra el ciclo de vida de dicha bacteria, que principalmente consiste en la fase vegetativa que se da cuando existen todas las condiciones para desarrollarse normalmente. La segunda fase corresponde a la esporulación, que tiene lugar cuando no existen las condiciones para la reproducción normal de la bacteria, en condiciones anaerobias, entra en esta fase para conservar la especie y germinar, que esta es la tercera fase, cuando las condiciones sean las óptimas.



**Figura 4. Ciclo de vida de *Bacillus subtilis* [19].**

#### 4.8 Morfología de *Bacillus subtilis*

*Bacillus subtilis* tiene colonias de 2 a 4 mm de diámetro, betahemolíticas con hemólisis completa, que pueden ser de aspecto liso, mucoso o rugoso; los bordes pueden ser ondulados o extendidos en el medio y ocasionalmente dan la apariencia de cultivos mixtos como se muestra en la figura 5.



**Figura 5. Morfología de *Bacillus subtilis* [20].**

#### 4.9 Análisis de materia seca para composición de bacterias.

Para que las bacterias crezcan y se reproduzcan de manera óptima se debe tener un medio que cumpla con los requerimientos óptimos para esta finalidad, se debe tener los niveles necesarios de fuente de carbono, de nitrógeno, de fósforo, principalmente para el crecimiento bacteriano, se determinan los requerimientos de estos nutrientes mediante un análisis de biomasa de materia seca, donde los resultados dicen que cantidad y de que está conformada dicha biomasa bacteriana, los resultados de estos análisis son (cuadro 2):

**Cuadro 2. Requerimientos de nutrientes por gramo de materia seca. Cantidades de nutrientes usados en este experimento [21].**

Nutriente	Requerimiento mínimo por gramo de materia seca	Nivel mínimo de nutrientes (g/L) en el medio de cultivo
Carbono	50 mg	3.09
Nitrógeno	0.15 mg	1.21
Fósforo	0.015 mg	0.12
Potasio	0.005 mg	0.021

#### 4.10 Casos exitosos de producción de *Bacillus subtilis* en biorreactores

Ghasemi y Ahmadzadeh [22], realizaron un proyecto similar a este dónde, optimizaron un medio de cultivo rentable para la producción a gran escala de *B. subtilis*; usaron para el medio de cultivo, melaza de caña de azúcar, como fuente de carbono, usaron también, fertilizantes de uso común, de fuente de fósforo usaron fosfato diamónico o DAP, como fuente de calcio usaron dos compuestos, carbonato de calcio y cloruro de calcio, sulfato de magnesio y aceite líquido para evitar la espuma. El diseño fue una factorial de 3 factores con 5 niveles dando 16 corridas. Midieron la temperatura, el pH, la agitación (rpm), la relación carbono nitrógeno y el DAP, las mediciones se realizaron durante doce horas cada hora, todo esto en un biorreactor semi-industrial tipo lotes alimentados. Los resultados que la fuente de carbono es el factor que más influye en el crecimiento bacteriano, y que el pH óptimo fue de 6.72. la concentración más alta de bacterias por litro fue de 0.55 gr/L. Además

de la producción de *Bacillus* a gran escala, hicieron pruebas para el control de *Aspergillus flavus* en pistacho, obteniendo una buena inhibición del crecimiento.

Sreekumar y Soundarajan, [23] realizaron un estudio para la producción de *Bacillus subtilis* usando una metodología de superficie de respuesta donde, tuvieron un experimento con 11 factores con 8 variables: lactosa, peptona, glucosa, temperatura, citrato de amonio, extracto de carne, acetato de sodio y pH. Además de dihidrogeno-fosfato de potasio, cloruro de sodio y sulfato de sodio en los mismos niveles que las variables no asignadas. Donde se tomaron muestras a las 24 horas de fermentación y se contaron unidades formadoras de colonias en placa. El pH, el citrato de amonio y la peptona, mejoraron significativamente el crecimiento bacteriano, la concentración mayor que lograron fue  $10.052 \times 10^9$ .

Zhong y otros, [24] aislaron una nueva cepa de *B. subtilis* que tiene la capacidad de producir un antibiótico nuevo, un péptido llamado jjean que tiene actividad de antibiótico y a la vez de surfactante; que en estudios anteriores han demostrado que podría usarse como fungicida contra diversas enfermedades de los cultivos, incluida la marchitez por *Fusarium* en algodón, pudrición del tomate por *Rhizoctonia* y mildiú polvoroso del trigo; donde podría aumentar los rendimientos al controlar estas enfermedades. El medio de cultivo estuvo compuesto por glucosa, harina de soya como fuente de nitrógeno, extracto de levadura, sulfato de magnesio y fosfato diamónico o DAP. El biorreactor fue un tipo fed batch de 5 litros, al cual se les agregó la glucosa y el extracto de levadura a las 10 horas de fermentación. Los factores que se midieron fueron el pH, la temperatura, el nivel de nitrógeno y la fuente de carbono, en 12 horas de fermentación. El nivel más alto de crecimiento bacteriano fue 77.5 gr/L en peso seco, el nivel óptimo de la fuente de nitrógeno fue 1.68 gr/L y de carbono fue 30.70 gr/L.

Posada y Villegas [25] hicieron un experimento en el cual probaron varios componentes del medio de cultivo donde evaluaron la reproducción de *Bacillus subtilis* y ver su capacidad de esporulación y calidad de esporas. Evaluaron los ocho componentes del medio de cultivo a tres niveles de concentración para ver diferencias en el número de bacterias totales, densidad de esporas, eficiencia de esporulación en matraz en agitación. Los componentes fueron glucosa, sulfato de magnesio, cloruro de manganeso, fosfato diamónico, extracto de levadura, extracto de carne, peptona, y sulfato de amonio. Alcanzaron una concentración de  $8.78 \times 10^9$  UFC/ml, además de una eficiencia de esporulación de 94.2% a nivel de biorreactor, siendo la eficiencia de esporulación de más alto de todos los reportados hasta ese año.

Willenbacher y otros, [26] realizaron un experimento para mejorar el rendimiento de surfactina producida por *B. subtilis*, en un biorreactor tipo benchtop de 2.5 litros, con el medio de cultivo Cooper mejorado, glucosa con 12 diferentes dosis, sulfato de amonio, sulfato de magnesio, fosfato diamónico, fosfato de sodio, citrato de sodio, cloruro de calcio, sulfato ferroso y sulfato de manganeso. Hicieron periodos de fermentación de 30 y 50 horas, tomando muestras cada 3 horas, contando bacterias en placa, con medio agar sangre. El mayor rendimiento fue de 36.5 gr/L de surfactina, con un inóculo del 5% [27].

Ashnaei y otros, [28] realizaron una investigación del crecimiento de *Bacillus subtilis* y *Pseudomonas fluorescences* para el control del moho gris (*Botrytis cinerea*) en manzana, todo esto en el año 2008. Evaluaron 5 medios diferentes, como fuente de carbono usaron sacarosa y melaza, como fuente de nitrógeno usaron urea y extracto de levadura. El primero fue sacarosa más extracto de levadura; el segundo fue melaza con extracto de levadura en proporción 2:1, el tercero fue melaza, extracto de levadura proporción 1:1, el cuarto fue melaza más

urea, el quinto fue melaza y extracto de malta y CN, en biorreactor a nivel de laboratorio. Tuvieron como resultado que el extracto de levadura provee un rápido crecimiento bacteriano en combinación con melaza, pero la sacarosa comercial tuvo más crecimiento bacteriano que la melaza, es por eso por lo que la combinación de sacarosa con extracto de levadura resultó ser los componentes del medio de cultivo óptimo para la producción de bacterias benéficas.

Yáñez-Mendizábal y otros, [29] produjeron *Bacillus subtilis* para el control de la podredumbre marrón producto del hongo *Metschnikowia fructicola* en durazno. Usaron un biorreactor BIOSTAT-A modular de 5 litros, las fermentaciones fueron en lotes con el medio de cultivo de bajo costo como fuente de carbono usaron melaza, sacarosa y maltosa; como fuente de nitrógeno usaron extracto de levadura, peptona, harina de soya, soya molida, harina de soya light 44%. Midieron pH, temperatura, oxígeno disuelto y concentración de oxígeno constantemente con un software.

Las variables que midieron fueron el crecimiento bacteriano a las 24, 48 y 72 horas; así como la evolución de la población bacteriana viable cada 2 horas durante 30 horas. Lograron una concentración final de  $3 \times 10^9$ .

Carvalho y otros, [30] realizaron las pruebas para la producción de compuestos bioactivos para el control de algunas enfermedades de los cultivos, evaluaron el crecimiento de *B. subtilis*. Varios niveles de glucosa y sulfato de amonio, además de fosfato diamónico, sulfato de magnesio, cloruro de calcio, sulfato ferroso, cloruro de manganeso, cloruro de zinc, cloruro de cobre, cloruro de cobalto y molibdato de sodio, fueron los ingredientes para estas pruebas. Utilizaron un biorreactor tipo fed batch de 4 litros. A las 24 horas de fermentación tuvieron la mayor concentración de esporas,  $10^8$  UFC/ ml.

Yanyun y otros [31] realizaron un experimento para la producción de una sustancia secretada por *Bacillus subtilis* que se usa como aditivo para productos lácteos y saborizantes; usaron un biorreactor de 5 litros y un medio de cultivo con ingredientes de bajo costo como lo son: fosfato diamónico y sulfato de magnesio, además glucosa como fuente de energía, que no es tan barata y las variables evaluadas fueron las cantidades de las fuentes de nitrógeno: extracto de levadura (5, 10, 20, 30, 40 g/L), fécula de maíz (5, 10, 20, 30, 40 g/L) y urea (urea 1.50 g/L,  $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$  3.30 g/L,  $\text{KNO}_3$  5.05 g/L); tuvieron la producción máxima de acetoina (39.9 g/L) a las 72 horas de fermentación en el medio que contenía 150 g/L de glucosa y 40 g/L de extracto de levadura.

Gallardo [32] evaluó la producción de *Bacillus subtilis*, usando harina de soya como fuente de nitrógeno y melaza de caña como fuente de carbono, esto comparándolo con medios de cultivo que uso Matsumoto en la producción de *Streptococcus mutans*, teniendo como resultado una concentración de  $3 \times 10^9$ , reportando que estos ingredientes de bajo costo tuvieron más influencia que los componentes de síntesis química.

Cobo [33] evaluó varios medios de cultivo cambiando la fuente de nitrógeno además de un caldo base que contenía fosfato dipotásico, cloruro de potasio, sulfato de magnesio, sulfato ferroso. Las fuentes de nitrógeno que uso fueron leche azucarada, suero de leche, bebida de soya fortificada y levadura comercial; obteniendo en el medio que contenía como fuente de nitrógeno la bebida soya fortificada la mayor concentración de  $3.07 \times 10^{12}$ .

Ojeda [34] produjo *Bacillus subtilis* en un biorreactor tipo lotes alimentados de 9 litros de capacidad donde solo contó el total de crecimiento bacteriano a las 72 horas de fermentación, alcanzando el máximo a las 48 horas, para formular

productos comerciales a base de esta bacteria. El medio de cultivo que uso fue: Melaza de remolacha, azúcar, extracto de levadura, sulfato de amonio, fosfato monopotásico, agua de la llave y un antiespumante. Tuvo como resultado una concentración de  $3.64 \times 10^9$  UFC/ml, pasando este producto a un liofilizador para hacer un producto comercial.

Božić y otros [35] evaluaron el efecto de diferentes fuentes de carbono y nitrógeno en el medio de cultivo para la producción de biomasa de *Bacillus subtilis*, usaron almidón y triptona como fuentes de carbono y como fuente de nitrógeno, sulfato de amonio y extracto de levadura; además de los demás ingredientes de base como lo son: sulfato de magnesio, fosfato monopotásico, cloruro de sodio y cloruro de calcio.

Usó un biorreactor de 2 litros con sensores de pH y oxígeno disuelto, donde llegaron a la conclusión de que el medio de cultivo que arrojó mayor crecimiento fue el que contenía peptona y almidón; la mayor concentración de bacterias en el medio la alcanzaron a las 8 horas de fermentación, siendo  $1.76 \times 10^{10}$ .

Muis [36] evaluó varias fuentes de carbono para la producción de *Bacillus subtilis*, usando ingredientes de bajo costo como lo son: agua de coco y agua destilada como solvente. harina de maíz, harina de yuca, harina de arroz, azúcar morena y extracto de levadura como fuente de nitrógeno. También midió la turbidez en un espectrofotómetro *Spectronic 20D*, (DO= 600 nm) teniendo el mejor medio de cultivo el que contenía como solvente el agua de coco, azúcar morena y extracto de levadura, teniendo un rendimiento de  $1.8 \times 10^9$  a las 10 horas de fermentación.

Nhu y otros [37] evaluaron medios de cultivo para la producción de biomasa de *Bacillus subtilis* para el tratamiento de aguas residuales ricas en almidón por la

industria que procesa las plantas de *Canna edulis* var. Ker. Evaluó los factores que más inciden en el crecimiento bacteriano que fueron la fuente de carbono y nitrógeno en el medio de cultivo y la agitación. Como fuente de carbono uso: lactosa, sacarosa, glucosa, CMC y almidón. Como fuente de nitrógeno usó: sulfato de amonio, nitrato de sodio, extracto de levadura, peptona y sus combinaciones. El medio en el que alcanzó la mayor concentración de bacterias fue el que tenía glucosa como fuente de carbono, combinado con el que tenía peptona como fuente de nitrógeno; teniendo una concentración máxima de 11.98 log CFU/ml a las 24 horas de fermentación.

Ling [38] evaluó la cascara de cebada y el salvado de trigo como fuentes de carbono para la producción de xilanas por *Bacillus subtilis*. Esta enzima es usada en la industria de la celulosa, para panadería y alimentos en general para hidrolizar componentes difíciles de digerir. El medio de cultivo para el biorreactor contenía cascara de trigo, peptona, extracto de levadura, fosfato monopotásico, sulfato de magnesio, sulfato de manganeso, sulfato de cobre, y sulfato ferroso con 12 horas de fermentación. El mayor número de células de *B. subtilis* se obtuvieron a las 48 horas, teniendo  $1.79 \times 10^{10}$  células/ml, con una producción de xilanas de 13 U/ml.

Miranda y otros, [39] evaluaron residuos agroindustriales producidos en Costa Rica para formular un medio de cultivo de bajo costo para la producción de *B. subtilis*, donde las variables que evaluaron fueron las fuentes de carbono, nitrógeno, y fósforo. Como fuente de nitrógeno evaluaron nitrato de amonio, salvado de trigo y extracto de levadura. El mayor crecimiento bacteriano lo obtuvieron con el medio que contenía melaza al 10%, salvado de trigo al 5%, fosfato diamónico al 0.01% y una concentración de  $1.7 \times 10^9$  UFC/ml.

Cho y otros [40] evaluaron la producción de biomasa de *B. subtilis*, *B. licheniformis* y *B. coagulans* por medio de diseños estadísticos. Evaluaron la

influencia de las fuentes de carbono y nitrógeno, midiendo el pH y la absorbancia (DO=600) en un biorreactor de 2.5 litros con fermentaciones por lotes. Estos autores usaron en el medio de cultivo, extracto de levadura, almidón, harina de soya, sulfato de amonio, fosfato monoamónico, cloruro de calcio y sulfato de magnesio; con lo que obtuvieron qué, a las 12 horas de fermentación el medio con mayor crecimiento bacteriano fue el que contenía 30 gr/l de harina de soya, 6 gr/l de sulfato de amonio y 6 gr/l de sulfato de magnesio, además, cuanto más se incrementaba la cantidad de harina de soya en el medio, más aumentaba la cantidad de bacterias por litro, dando como resultado una concentración final de  $5 \times 10^9$  UFC/ml.

Plaza y otros, [41] evaluaron varios desechos agroindustriales para el crecimiento de *Bacillus subtilis*, después del crecimiento, usaron esta bacteria para la producción de un biosurfactante. Los desechos agroindustriales fueron: suero, aguas residuales de queserías, bagazo de cebada, aguas residuales de cervecería, aguas residuales de ingenios azucareros, pulpa de remolacha, melaza, pasta de jabón, aguas residuales de fábricas de jabón, decocción de manzana y papa, orujos de cítricos y decocción de frutas y hortalizas de una fábrica agroindustrial; se procesaron todas las estas materias primas, las aguas residuales se filtraron, los residuos de frutas y hortalizas se hirvieron, y los líquidos como la melaza se diluyeron. Además de agregar el medio de cultivo mínimo (MM), que consiste en nitrato de potasio, fosfato de sodio, fosfato monopotásico, cloruro de sodio, sulfato de magnesio, cloruro de calcio y sulfato ferroso para diluir los desechos.

Se hicieron las pruebas de fermentación en matraces agitados y midiendo en crecimiento bacteriano mediante espectrofotometría, ajustando la densidad óptica a 600 nm, donde el medio con decocción de frutas y vegetales mostró ser el mejor medio de cultivo para el crecimiento bacteriano, logrando a las 96 horas de fermentación una concentración de aproximadamente  $1.12 \times 10^{10}$  UFC/ml.

Porcel [42] probó residuos de frutas, lácteos y sus combinaciones para la producción de bacterias promotoras del crecimiento. Las bacterias crecieron mejor en el control, que fue solo agua de peptona, los demás tratamientos mostraron menos crecimiento bacteriano; obteniendo un rendimiento de 7 *log* UFC/ml.

#### 4.11 *Bacillus subtilis* como agente de control biológico

*Bacillus brevis* y *B. subtilis* son las rizobacterias con mayor capacidad antagónica contra fitopatógenos. Estas bacterias se pueden encontrar en el suelo, agua, aguas tratadas, materia verde en descomposición y en compostas, ya sea por inoculación y por qué iban en los materiales usados, tracto digestivo y las raíces de las plantas. Estas bacterias han sido usadas en diversos cultivos como: hortalizas, como desintegradores de materia verde para compostas, inoculación de semillas y en la producción de pan [43].

## V. MATERIALES Y MÉTODOS

La investigación se realizó en el laboratorio de producción de microorganismos benéficos del Instituto Tecnológico El Llano Aguascalientes. Ubicación geográfica: 21.817842, -102.099679.



**Figura 6. Laboratorio de producción de microorganismos benéficos.**

### 5.1 Descripción del laboratorio.

Se utilizó un biorreactor *Airlift*, construido a partir del diseño del Doctor Luis Lorenzo Valera Montero. Además, se probaron una serie de medios nutritivos en función de combinaciones de fertilizantes y fuentes de carbono (Cuadro 5) para la correcta alimentación de la rizobacteria. Esto es necesario ya que, de no cumplir con los nutrimentos, se tiene un desarrollo bajo y una reproducción muy pobre.

Se construyó un biorreactor con un recipiente de 60 litros, con 2 bombas de pecera don una capacidad de 27 litros cada una, además de las mangueras y tramos de tubo de 35 cm para el diseño del reactor es de la autoría del Dr. Luis Lorenzo Valera Montero.

### 5.2 Medios de cultivo de bajo costo.

Los medios de cultivo se formularon partiendo de los reportes de requerimientos nutricionales por paquetes celulares en base a análisis de materia seca dichos niveles de nutrimentos fueron determinados por el Dr. Luis Lorenzo Valera Montero, donde en los primeros experimentos se usaron componentes de bajo costo en diferentes cantidades, como lo muestra el Cuadro 3.

**Cuadro 3. Componentes de los medios de cultivo.**

Fuente de carbono	Fuente de nitrógeno	Fuente de fósforo	Fuente de potasio	Inóculo
Azúcar	Sulfato de amonio	Superfosfato de calcio triple	Ultra-K 00-32-53	Serenade®

### 5.3 Métodos estadísticos

El método estadístico, fueron diseños experimentales de Taguchi, que están basados en arreglos ortogonales, que normalmente se identifican con un nombre como L<sub>27</sub> corridas. Los diseños ortogonales permiten la eliminación de varias

combinaciones, así como eliminar las pruebas repetitivas, lo que los convierte en diseños eficientes, robustos y que reducen los costos. El programa estadístico que permite hacer estos diseños estadísticos es el Minitab.

### 5.3.1 Experimento 1

El diseño para el primer experimento es con tres niveles y 5 factores, lo que resulta en un  $L_{27}$ . Donde se evaluaron 3 niveles en la fuente de nitrógeno (Sulfato de amonio), 3 niveles de la fuente de carbono (Azúcar), 3 dosis de la fuente de fósforo (Fosfato diamónico), 3 dosis en la fuente de potasio (Ultra-k), y 3 dosis en la fuente de inóculo (Serenade® de Bayer) con una concentración de  $1 \times 10^9$ .

**Cuadro 4. Niveles de los componentes del medio de cultivo e inóculo para 50 litros.**

Concepto	Bajo	Medio	Alto
Azúcar	154.5	463.5	772.5
S.A.	60.5	181.5	302.5
Fósforo	6.3	18.9	31.5
Ultra K	1.05	3.15	5.25
Inóculo	1.1	3.3	5.5

**Cuadro 5. Composición del medio de cultivo de cada corrida del experimento 1.**

Corrida	Azúcar	S. A.	Fósforo	Ultra K	Cepa
L <sub>1</sub>	154.5	60.5	6.3	1.05	1.1
L <sub>2</sub>	154.5	60.5	6.3	1.05	3.3
L <sub>3</sub>	154.5	60.5	6.3	1.05	5.5
L <sub>4</sub>	154.5	181.5	18.9	3.15	1.1
L <sub>5</sub>	154.5	181.5	18.9	3.15	3.3
L <sub>6</sub>	154.5	181.5	18.9	3.15	5.5
L <sub>7</sub>	154.5	302.5	31.5	5.25	1.1
L <sub>8</sub>	154.5	302.5	31.5	5.25	3.3
L <sub>9</sub>	154.5	302.5	31.5	5.25	5.5
L <sub>10</sub>	463.5	60.5	18.9	5.25	1.1
L <sub>11</sub>	463.5	60.5	18.9	5.25	3.3
L <sub>12</sub>	463.5	60.5	18.9	5.25	5.5
L <sub>13</sub>	463.5	181.5	31.5	1.05	1.1
L <sub>14</sub>	463.5	181.5	31.5	1.05	3.3
L <sub>15</sub>	463.5	181.5	31.5	1.05	5.5
L <sub>16</sub>	463.5	302.5	6.3	3.15	1.1
L <sub>17</sub>	463.5	302.5	6.3	3.15	3.3
L <sub>18</sub>	463.5	302.5	6.3	3.15	5.5
L <sub>19</sub>	772.5	60.5	31.5	3.15	1.1
L <sub>20</sub>	772.5	60.5	31.5	3.15	3.3
L <sub>21</sub>	772.5	60.5	31.5	3.15	5.5
L <sub>22</sub>	772.5	181.5	6.3	5.25	1.1
L <sub>23</sub>	772.5	181.5	6.3	5.25	3.3
L <sub>24</sub>	772.5	181.5	6.3	5.25	5.5
L <sub>25</sub>	772.5	302.5	18.9	1.05	1.1
L <sub>26</sub>	772.5	302.5	18.9	1.05	3.3
L <sub>27</sub>	772.5	302.5	18.9	1.05	5.5

Estas dosis son para un volumen de 50 litros, debido a que la medición de los factores se hizo en un mini biorreactor.

### 5.3.2 Experimento 2

Para el experimento 2, en función de los resultados preliminares, solo la fuente de carbono y de fósforo se tomaron los tres niveles, ya que fueron los que tuvieron más significancia en la turbidez; la fuente de nitrógeno se quedó en el nivel

medio, la fuente de potasio se quedó en el nivel bajo, así como la fuente de inóculo. Se obtuvo un diseño  $L_9$  con dos factores y tres niveles, como ya se mencionó los demás factores se quedaron en los niveles más altos.

Las mediciones de los parámetros para más importantes en el crecimiento bacteriano que son: la turbidez, el oxígeno disuelto, el pH y la temperatura se midieron cada hora durante 24 horas.

**Cuadro 6. Composición del medio de cultivo de cada corrida del experimento 2.**

Corrida	Azúcar	Fósforo	S. A	Ultra k	Inóculo
L <sub>1</sub>	154.5	6.3	181.5	1.05	1.1
L <sub>2</sub>	154.5	18.9	181.5	1.05	1.1
L <sub>3</sub>	154.5	31.5	181.5	1.05	1.1
L <sub>4</sub>	463.5	6.3	181.5	1.05	1.1
L <sub>5</sub>	463.5	18.9	181.5	1.05	1.1
L <sub>6</sub>	463.5	31.5	181.5	1.05	1.1
L <sub>7</sub>	772.5	6.3	181.5	1.05	1.1
L <sub>8</sub>	772.5	18.9	181.5	1.05	1.1
L <sub>9</sub>	772.5	31.5	181.5	1.05	1.1

### 5.3.3 Experimento 3

El experimento 3 fueron las mismas corridas que el experimento 2 excepto que las mediciones solo fueron por 12 horas.

**Cuadro 7. Composición del medio de cultivo de cada corrida del experimento 3.**

Corrida	Azúcar	Fósforo	S. A	Ultra K	Inóculo
L <sub>1</sub>	154.5	6.3	181.5	1.05	1.1
L <sub>2</sub>	154.5	18.9	181.5	1.05	1.1
L <sub>3</sub>	154.5	31.5	181.5	1.05	1.1
L <sub>4</sub>	463.5	6.3	181.5	1.05	1.1
L <sub>5</sub>	463.5	18.9	181.5	1.05	1.1
L <sub>6</sub>	463.5	31.5	181.5	1.05	1.1
L <sub>7</sub>	772.5	6.3	181.5	1.05	1.1
L <sub>8</sub>	772.5	18.9	181.5	1.05	1.1
L <sub>9</sub>	772.5	31.5	181.5	1.05	1.1

5.3.4 experimento 4

En este experimento se repitieron las cantidades del primer experimento, el L<sub>27</sub>, pero esta vez sustituyendo el azúcar por melaza, durante 12 horas midiendo los factores de crecimiento bacteriano.

En este caso, se utilizó melaza de caña de azúcar que tiene un costo muy bajo, además de su costo que es menor aún que el de la azúcar, sumándole otras sustancias que contiene, como aminoácidos, potasio y otros carbohidratos.

**Cuadro 8. Composición del medio de cultivo de cada corrida del experimento 4.**

Corrida	Melaza	S. A.	Fosforo	Ultrak	Cepa
L <sub>1</sub>	154.5	60.5	6.3	1.05	1.1
L <sub>2</sub>	154.5	60.5	6.3	1.05	3.3
L <sub>3</sub>	154.5	60.5	6.3	1.05	5.5
L <sub>4</sub>	154.5	181.5	18.9	3.15	1.1
L <sub>5</sub>	154.5	181.5	18.9	3.15	3.3
L <sub>6</sub>	154.5	181.5	18.9	3.15	5.5
L <sub>7</sub>	154.5	302.5	31.5	5.25	1.1
L <sub>8</sub>	154.5	302.5	31.5	5.25	3.3
L <sub>9</sub>	154.5	302.5	31.5	5.25	5.5
L <sub>10</sub>	463.5	60.5	18.9	5.25	1.1
L <sub>11</sub>	463.5	60.5	18.9	5.25	3.3
L <sub>12</sub>	463.5	60.5	18.9	5.25	5.5
L <sub>13</sub>	463.5	181.5	31.5	1.05	1.1
L <sub>14</sub>	463.5	181.5	31.5	1.05	3.3
L <sub>15</sub>	463.5	181.5	31.5	1.05	5.5
L <sub>16</sub>	463.5	302.5	6.3	3.15	1.1
L <sub>17</sub>	463.5	302.5	6.3	3.15	3.3
L <sub>18</sub>	463.5	302.5	6.3	3.15	5.5
L <sub>19</sub>	772.5	60.5	31.5	3.15	1.1
L <sub>20</sub>	772.5	60.5	31.5	3.15	3.3
L <sub>21</sub>	772.5	60.5	31.5	3.15	5.5
L <sub>22</sub>	772.5	181.5	6.3	5.25	1.1
L <sub>23</sub>	772.5	181.5	6.3	5.25	3.3
L <sub>24</sub>	772.5	181.5	6.3	5.25	5.5
L <sub>25</sub>	772.5	302.5	18.9	1.05	1.1
L <sub>26</sub>	772.5	302.5	18.9	1.05	3.3
L <sub>27</sub>	772.5	302.5	18.9	1.05	5.5

## VI. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 6.1 Primer experimento

#### 6.1.1 Oxígeno disuelto

Después de la fase preliminar de pruebas donde se evaluaron 27 diferentes niveles de fuentes de carbono, nitrógeno, potasio e inóculo, durante 12 horas con mediciones cada hora. En el cuadro 9 se tienen los resultados de todas las mediciones.

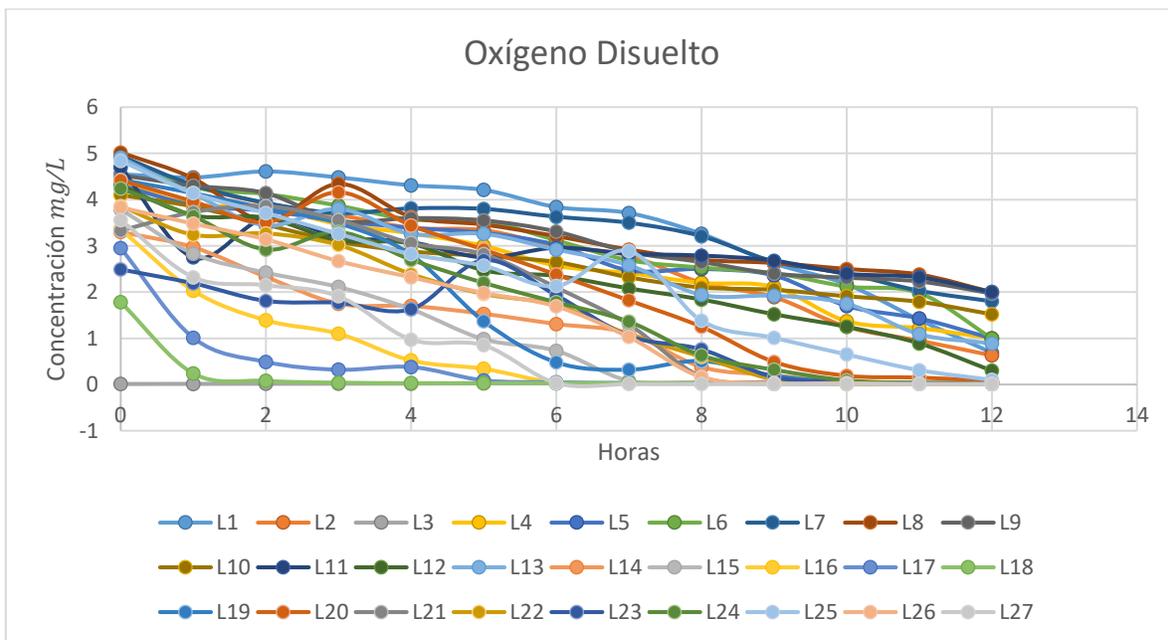
**Cuadro 9. Resultados del oxígeno disuelto en cada corrida durante 12 horas, cada hora.**

	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
L1	4.55	4.48	4.61	4.48	4.31	4.21	3.84	3.71	3.26	2.62	2.17	1.40	0.69
L2	4.94	4.30	3.92	3.67	3.39	3.34	3.00	2.79	2.20	1.89	1.25	0.95	0.63
L3	0.012	0.015	0.018	0.019	0.022	0.027	0.029	0.032	0.034	0.038	0.038	0.041	0.046
L4	4.34	3.90	3.83	3.47	3.27	3.00	2.57	2.41	2.20	2.11	1.37	1.22	1.00
L5	4.31	3.88	3.76	3.54	3.39	3.28	3.02	2.47	2.50	2.36	1.70	1.43	1.00
L6	4.89	4.27	4.12	3.87	3.57	3.54	3.12	2.69	2.53	2.41	2.12	1.98	1.00
L7	4.94	4.32	3.93	3.71	3.81	3.80	3.63	3.50	3.21	2.66	2.40	2.03	1.80
L8	5.02	4.46	3.54	4.34	3.63	3.46	3.21	2.92	2.70	2.63	2.50	2.38	2.00
L9	4.53	4.30	4.14	3.54	3.60	3.55	3.31	2.87	2.65	2.40	2.31	2.23	1.97
L10	4.10	3.85	3.46	3.09	2.88	2.78	2.65	2.32	2.10	2.05	1.91	1.79	1.52
L11	4.70	2.75	3.60	3.20	3.08	2.75	2.96	2.83	2.79	2.68	2.4	2.32	2.00
L12	4.30	3.66	3.61	3.12	3.05	2.47	2.35	2.08	1.84	1.52	1.25	0.89	0.30
L13	4.91	4.13	3.44	3.80	3.26	3.26	2.92	2.58	1.94	1.92	1.75	1.09	0.89
L14	3.30	2.97	2.33	1.75	1.70	1.53	1.31	1.11	0.38	0.20	0.05	0.03	0.01
L15	3.79	2.83	2.42	2.11	1.63	0.98	0.73	0.08	0.05	0.01	0.01	0.01	0.01
L16	3.36	2.03	1.39	1.10	0.52	0.34	0.04	0.03	0.03	0.03	0.03	0.03	0.03
L17	2.95	1.01	0.49	0.32	0.38	0.09	0.05	0.03	0.03	0.03	0.03	0.03	0.03
L18	1.78	0.24	0.08	0.04	0.03	0.03	0.03	0.03	0.03	0.03	0.03	0.03	0.03
L19	4.43	4.14	3.81	3.49	2.81	1.37	0.48	0.32	0.51	0.19	0.05	0.03	0.03
L20	4.42	3.96	3.51	4.16	3.44	2.92	2.38	1.82	1.25	0.49	0.19	0.15	0.08
L21	3.33	3.73	3.86	3.56	3.06	2.82	2.10	1.30	0.17	0.05	0.03	0.03	0.03
L22	3.86	3.24	3.27	3.02	2.39	1.96	1.72	1.08	0.60	0.11	0.01	0.01	0.01
L23	2.49	2.19	1.81	1.77	1.63	2.69	1.93	1.05	0.76	0.16	0.06	0.03	0.01
L24	4.24	3.64	2.92	3.3	2.70	2.20	1.78	1.36	0.63	0.32	0.09	0.03	0.01
L25	4.84	4.14	3.71	3.26	2.82	2.57	2.13	2.89	1.38	1.01	0.65	0.31	0.10
L26	3.83	3.48	3.14	2.67	2.32	1.98	1.69	1.03	0.16	0.03	0.03	0.01	0.01
L27	3.56	2.32	2.15	1.91	0.97	0.85	0.03	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01

Para el caso del oxígeno disuelto, el rango fue del mínimo 0.01  $mg/L$  y el máximo de 5.02  $mg/L$ , la tendencia fue la disminución de este al paso de las horas,

lo que, en primera instancia, estos datos muestran que entre más bacterias estén presentes en el medio, menos oxígeno disuelto hay en el medio, cada uno de los ingredientes tiene influencia directa sobre la concentración.

En la figura 7 se tiene como fue el comportamiento del oxígeno disuelto a través de las horas de fermentación, la tendencia fue que a manera que las horas pasaban, la concentración iba disminuyendo por efecto del crecimiento bacteriano.



**Figura 7. Comportamiento del oxígeno disuelto del primer experimento.**

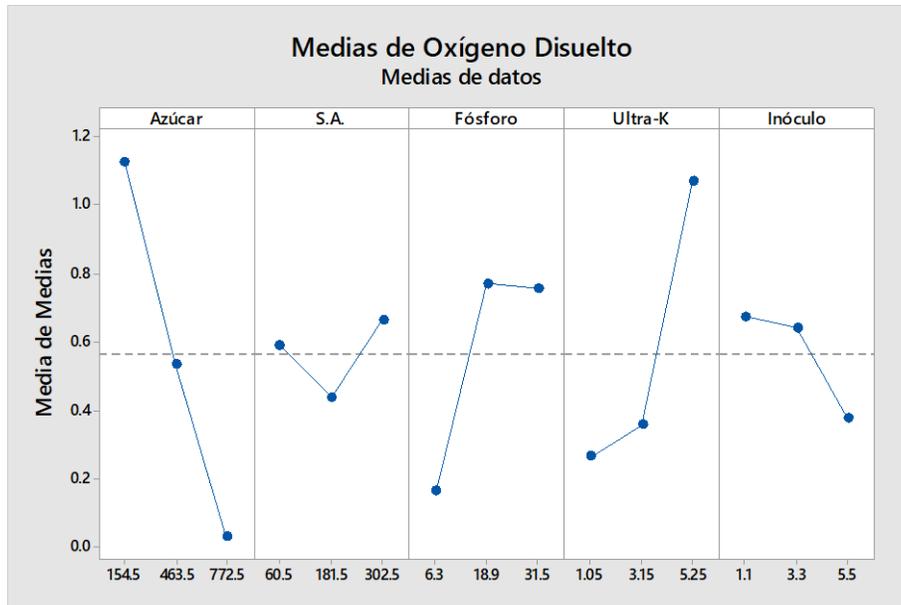
El Cuadro 10 muestra el análisis de varianza de medias, el cual muestra que el azúcar, el superfosfato de calcio simple y el Ultra-K tienen el nivel de significancia por debajo de  $\alpha=0.05$ , por lo cual estos factores influyen directamente en la bajada de la concentración del oxígeno disuelto

**Cuadro 10. ANOVA del parámetro de oxígeno disuelto.**

<b>Análisis de Varianza de Medias</b>						
<b>Fuente</b>	<b>GL</b>	<b>SC Sec.</b>	<b>SC Ajust.</b>	<b>MC Ajust.</b>	<b>F</b>	<b><i>p</i></b>
<b>Azúcar</b>	2	5.3972	5.3972	2.6986	23.18	0.000
<b>SA</b>	2	0.2411	0.2411	0.1206	1.04	0.378
<b>Fósforo</b>	2	2.1560	2.1560	1.0780	9.26	0.002
<b>Ultra-K</b>	2	3.4709	3.4709	1.7354	14.91	0.000
<b>Inóculo</b>	2	0.4732	0.4721	0.2366	2.03	0.164
<b>Error Residual</b>	16	1.8628	1.8628	0.1164		
<b>Total</b>	26	13.6012				

En el caso de la reacción del oxígeno a las dosis de azúcar, se encontró que entre más alta es la concentración de azúcar en el medio, el oxígeno disuelto baja de manera estrepitosa, causando que las bacterias no se reproduzcan en las cantidades que deberían. La dosis baja mostró una cantidad alta, la dosis media un decremento y la dosis alta generó una disminución a tal grado que no quedaba dosis para el consumo o mantenimiento de las bacterias.

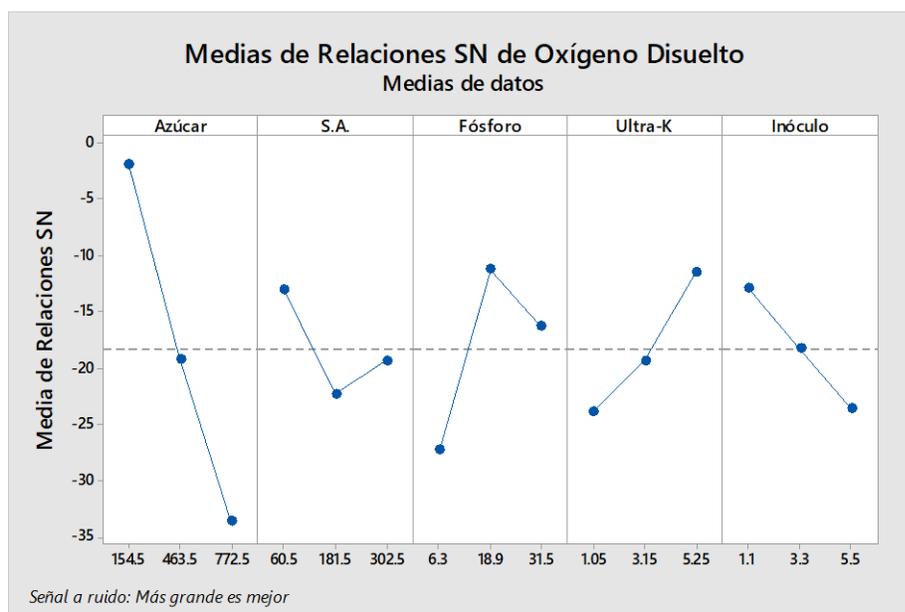
En la figura 8 se tienen las medias de las medias de cada factor; el azúcar, en su nivel alto es el que más influye negativamente en la concentración del oxígeno disuelto.



**Figura 8. ANOVA de medias del oxígeno disuelto del primer experimento.**

Para el caso del sulfato de amonio, no hubo una gran significancia ya que se mantuvo cerca de la media en los 3 niveles, el nivel medio presentó una ligera bajada en la concentración del oxígeno, contrariamente a el nivel alto que presento un aumento. Esto se considera que no cumple con la significancia porque se mantuvo cerca de la media. La fuente de fósforo presentó un aumento significativo del nivel al nivel medio, y un ligero decremento del nivel medio al nivel alto. Esto a su vez indica que el fósforo presenta poca respuesta en cuanto a la concentración de oxígeno disuelto. Para la fuente de potasio, presentó una significancia alta ya que en función del nivel aplicado fue aumentando la concentración de oxígeno disuelto de una manera significativa alejándose de la media en cada aumento del nivel de potasio. Entre más potasio, más oxígeno disuelto. El inóculo no tuvo efecto sobre la concentración del oxígeno, se comportó parecido el nivel bajo que el nivel alto, por lo tanto, lo recomendado es el uso del nivel bajo.

El ANOVA de las relaciones de señal/ruido (figura 9), se ve una similitud con la figura 7, en este caso el azúcar fue significativo ya que estuvo por debajo de  $\alpha=0.05$ .



**Figura 9. ANOVA de relaciones de señal/ruido del oxígeno disuelto del primer experimento.**

El otro factor que tuvo influencia en la concentración del oxígeno en el medio fue el fósforo, como se muestra en el cuadro 10, su nivel de significancia estuvo por debajo de  $\alpha=0.05$ .

**Cuadro 11. ANOVA de relaciones de señal/ruido para oxígeno disuelto.**

Análisis de Varianza de Relaciones SN						
Fuente	GL	SC Sec.	SC Ajust.	MC Ajust.	F	P
Azúcar	2	241.398	241.398	120.699	7.03	0.006

<b>SA</b>	2	12.234	12.234	6.117	0.36	0.706
<b>Fósforo</b>	2	127.515	127.515	63.758	3.72	0.047
<b>Ultra-K</b>	2	2.884	2.884	1.442	0.08	0.920
<b>Inóculo</b>	2	7.934	7.934	3.967	0.23	0.796
<b>Error Residual</b>	16	274.543	274.543	17.159		
<b>Total</b>	26	666.509				

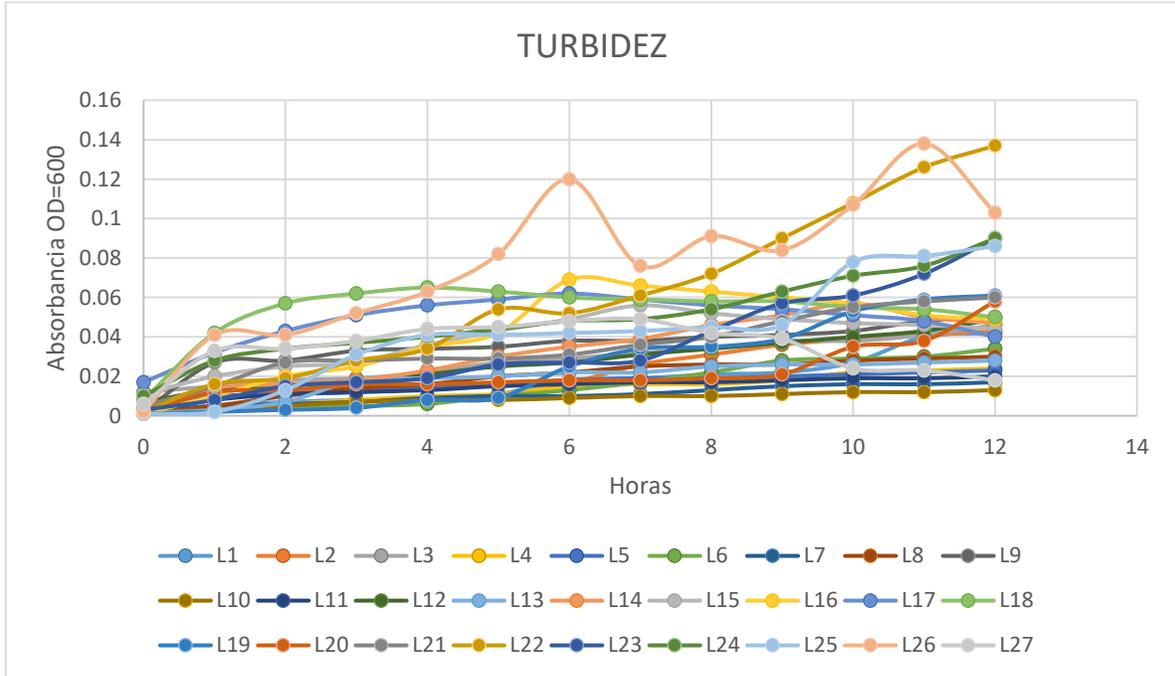
En el caso de las relaciones señal/ruido, muestra una significancia de  $\leq 0.05$ , lo que indica que tanto el azúcar como el fósforo influyen directamente en los niveles de oxígeno disuelto, el resto de los ingredientes causa cierto ruido en los niveles antes dichos.

#### 6.1.2 Turbidez

La turbidez se mide en un espectrofotómetro con una OD=600 nm, primero con el blanco sin inóculo para hacer la comparativa de la absorbencia.

En el caso de la turbidez, los rangos de medición fueron desde 0.001 hasta 0.137 en absorbencia la tendencia fue el aumento de la absorbencia con el paso de las horas, estos datos a simple vista muestran que, en función de los diferentes medios de cultivo, las bacterias iban reproduciéndose más rápido en algunos medios, logrando así que, en determinadas corridas, la reproducción y crecimiento bacteriano se diera en poco tiempo.

En la figura 10 se muestra el comportamiento de la turbidez conforme pasaban las horas de fermentación, la tendencia fue que, al paso de las horas, la concentración de bacterias en el medio crecía en función de la composición del medio de cultivo.



**Figura 10. Comportamiento de la turbidez del experimento 1.**

En el cuadro 12 se tienen todas las mediciones de cada corrida, donde se empieza a notar la tendencia del crecimiento bacteriano que, al paso de las horas, fue aumentando gradualmente.

**Cuadro 12. Resultados de turbidez del primer experimento.**

	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
L1	0.002	0.005	0.007	0.008	0.009	0.011	0.018	0.019	0.021	0.022	0.027	0.040	0.042
L2	0.005	0.009	0.012	0.014	0.015	0.016	0.017	0.026	0.031	0.036	0.039	0.041	0.043
L3	0.012	0.015	0.018	0.019	0.022	0.027	0.029	0.032	0.034	0.038	0.038	0.041	0.046
L4	0.001	0.005	0.006	0.008	0.01	0.011	0.015	0.016	0.016	0.018	0.022	0.023	0.024
L5	0.007	0.010	0.011	0.012	0.015	0.016	0.018	0.019	0.019	0.020	0.021	0.022	0.023
L6	0.002	0.004	0.005	0.005	0.006	0.010	0.013	0.017	0.022	0.028	0.029	0.030	0.034
L7	0.002	0.005	0.006	0.007	0.009	0.010	0.010	0.011	0.013	0.015	0.016	0.016	0.017
L8	0.001	0.005	0.010	0.014	0.016	0.020	0.022	0.025	0.026	0.026	0.028	0.029	0.030
L9	0.002	0.027	0.028	0.033	0.034	0.035	0.038	0.038	0.040	0.041	0.043	0.048	0.050
L10	0.002	0.003	0.005	0.007	0.008	0.008	0.009	0.010	0.010	0.011	0.012	0.012	0.013
L11	0.002	0.008	0.011	0.012	0.013	0.015	0.016	0.017	0.017	0.018	0.019	0.019	0.020
L12	0.007	0.013	0.015	0.018	0.021	0.025	0.027	0.031	0.034	0.037	0.040	0.043	0.049
L13	0.001	0.003	0.007	0.018	0.019	0.020	0.022	0.022	0.025	0.026	0.026	0.027	0.028
L14	0.002	0.014	0.016	0.018	0.023	0.030	0.035	0.039	0.046	0.051	0.057	0.050	0.047
L15	0.011	0.020	0.025	0.027	0.036	0.043	0.049	0.056	0.052	0.049	0.047	0.046	0.044
L16	0.001	0.010	0.020	0.025	0.035	0.042	0.069	0.066	0.063	0.060	0.057	0.051	0.049
L17	0.017	0.032	0.043	0.051	0.056	0.059	0.062	0.059	0.056	0.054	0.051	0.048	0.040
L18	0.008	0.042	0.057	0.062	0.065	0.063	0.060	0.059	0.058	0.058	0.055	0.054	0.050
L19	0.001	0.002	0.003	0.004	0.008	0.009	0.025	0.034	0.035	0.039	0.053	0.059	0.061
L20	0.002	0.012	0.013	0.016	0.016	0.017	0.018	0.018	0.019	0.021	0.035	0.038	0.058
L21	0.005	0.015	0.027	0.028	0.029	0.029	0.031	0.036	0.040	0.048	0.055	0.058	0.060
L22	0.002	0.016	0.019	0.028	0.034	0.054	0.052	0.061	0.072	0.090	0.108	0.126	0.137
L23	0.003	0.008	0.015	0.017	0.019	0.026	0.027	0.028	0.043	0.057	0.061	0.072	0.090
L24	0.010	0.028	0.034	0.037	0.040	0.044	0.048	0.049	0.054	0.063	0.071	0.076	0.090
L25	0.001	0.002	0.013	0.031	0.041	0.041	0.042	0.043	0.045	0.046	0.078	0.081	0.086
L26	0.002	0.041	0.041	0.052	0.063	0.082	0.120	0.076	0.091	0.084	0.107	0.138	0.103
L27	0.006	0.033	0.034	0.038	0.044	0.045	0.048	0.049	0.042	0.039	0.024	0.023	0.018

El análisis de datos arrojó que el azúcar tiene influencia directa a la absorbencia, a mayor cantidad de azúcar, más bacterias crecen en el medio, pero disminuye la concentración de oxígeno disuelto, es muy significativo el aumento de la absorbencia de la muestra en cada punto de concentración, siendo en el punto alto el mayor crecimiento bacteriano. En el caso del sulfato de amonio esta fuente de nitrógeno no tuvo gran significancia en el crecimiento bacteriano, el nivel alto y el nivel bajo tuvieron baja respuesta a diferencia del punto medio que fue el más alto. El fósforo mostró una significancia alta. El nivel bajo mostró un crecimiento bastante alto en comparación con los niveles medio y alto, que, no hubo mucha diferencia entre estos niveles, a menor nivel de fósforo más crecimiento bacteriano, por lo tanto, el costo del medio de cultivo baja ya que el fósforo es el material más caro de todos los ingredientes. El análisis arrojó que la fuente de potasio no tuvo gran significancia ya que los niveles se mantuvieron cerca de la media. Aunque el nivel alto mostró un ligero aumento en el crecimiento bacteriano. El inóculo fue el que presentó menor significancia de todos los ingredientes del medio, debido a que

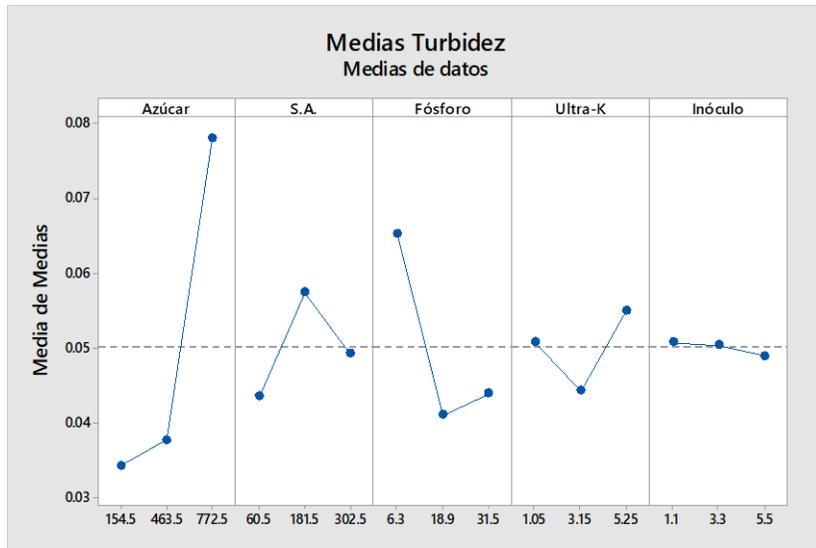
todos los niveles están cerca de la media, lo que indica que se puede usar la dosis baja.

El azúcar y el superfosfato de calcio triple, como se muestra en el cuadro 13, son los que tuvieron significancia en la turbidez, están por debajo del valor  $\alpha=0.10$ , debido a esto, se tiene la certeza que estos factores afectan positivamente en el número de bacterias en el medio de cultivo.

**Cuadro 13. ANOVA del parámetro de turbidez del primer experimento.**

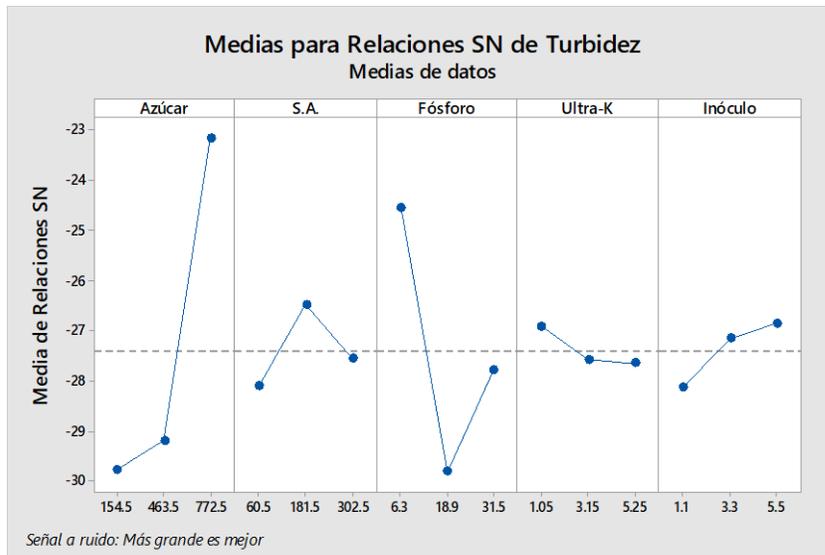
<b>Análisis de Varianza de Medias</b>						
<b>Fuente</b>	<b>GL</b>	<b>SC Sec.</b>	<b>SC Ajust.</b>	<b>MC Ajust.</b>	<b>F</b>	<b>P</b>
<b>Azúcar</b>	2	0.010665	0.010665	0.005333	11.95	0.001
<b>SA</b>	2	0.000878	0.000878	0.000439	0.98	0.396
<b>Fósforo</b>	2	0.003133	0.003133	0.001566	3.51	0.054
<b>Ultra-K</b>	2	0.000529	0.000529	0.000265	0.59	0.564
<b>Inóculo</b>	2	0.000016	0.000016	0.000008	0.02	0.982
<b>Error Residual</b>	16	0.007141	0.007141	0.000446		
<b>Total</b>	26	0.022362				

El nivel alto de azúcar y el nivel bajo de superfosfato de calcio triple muestran un aumento en la turbidez como se muestra en la figura 11.



**Figura 11. ANOVA de medias de la turbidez del primer experimento.**

Las relaciones señal/ruido con alta significancia fueron el azúcar y la fuente de fósforo, además de eso hay una similitud de la figura 11 que es el ANOVA de medias con la figura 12 que es la de medias para relaciones de señal/ruido.



**Figura 12. ANOVA de relaciones de señal/ruido del oxígeno disuelto del primer experimento.**

Se confirma en el cuadro 14 que el azúcar y el fosforo afectan el crecimiento bacteriano positivamente según el análisis de medias de señal/ruido.

**Cuadro 14. ANOVA de relaciones de señal/ruido para turbidez del primer experimento.**

<b>Análisis de Varianza de Relaciones SN</b>						
<b>Fuente</b>	<b>GL</b>	<b>SC Sec.</b>	<b>SC Ajust.</b>	<b>MC Ajust.</b>	<b>F</b>	<b>p</b>
<b>Azúcar</b>	2	241.398	241.398	120.699	7.03	0.006
<b>SA</b>	2	12.234	12.324	6.117	0.36	0.706
<b>Fósforo</b>	2	127.515	127.515	63.758	3.72	0.047
<b>Ultra-K</b>	2	2.884	2.884	1.442	0.08	0.920
<b>Inóculo</b>	2	7.934	7.934	3.967	0.23	0.796
<b>Error Residual</b>	16	274.543	274.5430	17.159		
<b>Total</b>	26	666.509				

Como recomendación, el azúcar en su nivel alto es el factor que más influye en el crecimiento bacteriano, por lo tanto, se debe usar la cantidad de 772.5 gr/50lts de medio de cultivo. En el caso del sulfato del sulfato de amonio, lo recomendable es usar el nivel bajo 60.5 gr/50lts, ya que este factor no tuvo significancia en el aumento de la turbidez, así que lo más económico es usar la menor cantidad de este fertilizante. El superfosfato de calcio triple, al tener significancia, la recomendación es usar 6.3 gr/50lts de medio de cultivo, ya que en esta cantidad se presentó el mayor crecimiento bacteriano. El ultra-K, que es la fuente de potasio, no tuvo significancia, los 3 niveles se mantuvieron cerca de la media, por lo tanto, lo

recomendable es usar el nivel bajo, para economizar, se recomienda usar 1.05 gr/50lt de medio de cultivo. En el caso del inóculo (Serenade), al no tener significancia, lo recomendado es usar el nivel medio, 3.3 gr/50lts de medio de cultivo. En cuadro 15 se tiene la recomendación para la elaboración del medio de cultivo de este experimento.

**Cuadro 15. Recomendación de la fórmula 50 litros del primer experimento.**

Azúcar	772.5 gr
Sulfato de Amonio	60.5 gr
Super Fosfato de Calcio Triple	6.3 gr
Ultra-K	1.05 gr
Serenade	3.3 gr

### 6.1.3 pH

El pH no mostro significancia en cuanto al desarrollo bacteriano, estuvo en un rango de 6.4 a 7.6, en el uso del nivel de sulfato de amonio se notó una bajada de pH ya que es un fertilizante de reacción ácida. En el cuadro 16 se observan las mediciones del pH donde se notó que no cambiaba mucho.

**Cuadro 16. Resultados del pH del primer experimento.**

	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
L1	7.3	7.3	7.3	7.6	7.6	7.6	7.6	7.6	7.6	7.5	7.5	7.5	7.5
L2	7.3	7.4	7.6	7.6	7.6	7.6	7.6	7.6	7.5	7.5	7.5	7.5	7.5
L3	7.3	7.4	7.5	7.6	7.5	7.5	7.5	7.4	7.3	7.1	6.9	6.9	6.4
L4	7.2	7.3	7.3	7.4	7.5	7.5	7.4	7.4	7.4	7.4	7.4	7.4	7.4
L5	7.1	7.2	7.3	7.4	7.4	7.4	7.4	7.4	7.4	7.3	7.4	7.4	7.4
L6	7.2	7.3	7.3	7.3	7.4	7.4	7.4	7.5	7.4	7.4	7.4	7.4	7.4
L7	7.1	7.1	7.2	7.3	7.3	7.3	7.3	7.3	7.4	7.4	7.4	7.4	7.4
L8	7.1	7.2	7.3	7.3	7.3	7.4	7.4	7.4	7.4	7.4	7.4	7.4	7.4
L9	7.1	7.2	7.3	7.3	7.3	7.3	7.3	7.3	7.3	7.3	7.3	7.3	7.3
L10	7.2	7.3	7.4	7.5	7.5	7.5	7.5	7.5	7.5	7.4	7.4	7.4	7.4
L11	7.2	7.3	7.4	7.4	7.4	7.5	7.4	7.4	7.5	7.4	7.4	7.4	7.4
L12	7.2	7.2	7.3	7.4	7.4	7.5	7.4	7.4	7.5	7.4	7.4	7.4	7.4
L13	7.2	7.2	7.3	7.4	7.4	7.4	7.4	7.4	7.4	7.4	7.4	7.4	7.4
L14	7.2	7.3	7.3	7.4	7.4	7.4	7.4	7.4	7.4	7.4	7.4	7.4	7.4
L15	7.3	7.2	7.2	7.3	7.3	7.3	7.3	7.3	7.3	7.3	7.3	7.3	7.3
L16	6.9	7.1	7.1	7.1	7.1	7.1	7.2	6.8	6.9	6.6	6.3	6.3	6.3
L17	7.0	7.0	7.0	7.0	7.0	7.0	7.0	6.8	6.6	6.6	6.6	6.8	6.8
L18	6.9	7.0	7.1	7.1	7.1	7.1	7.1	7.1	7.1	7.1	7.1	7.1	7.1
L19	7.2	7.2	7.2	7.2	7.2	7.2	7.2	7.2	7.2	7.2	7.2	7.2	7.2
L20	7.3	7.3	7.3	7.3	7.3	7.3	7.3	7.3	7.3	7.3	7.3	7.3	7.3
L21	7.3	7.3	7.3	7.3	7.3	7.3	7.3	7.3	7.3	7.3	7.3	7.3	7.3
L22	7.0	7.1	7.1	7.1	7.1	7.1	7.1	7.1	6.9	6.9	6.9	7.0	7.0
L23	7.1	7.1	7.1	7.1	7.1	7.1	7.1	7.1	7.1	7.1	7.1	7.1	7.1
L24	7.0	7.0	7.0	7.0	7.0	7.0	7.0	7.0	7.0	7.0	7.0	7.0	7.0
L25	7.3	7.3	7.3	7.3	7.3	7.3	7.3	7.3	7.3	7.3	7.3	7.3	7.3
L26	7.0	7.0	7.0	7.0	7.0	7.0	7.0	7.0	7.0	7.0	7.0	7.0	7.0
L27	7.0	7.0	7.0	7.1	7.1	7.1	7.1	7.0	7.0	7.0	7.0	7.0	7.0

En este caso, el fósforo fue el que más influyó, teniendo el valor  $P$  más bajo ( $\alpha < 0.10$ ) de todos los factores que componen el medio de cultivo.

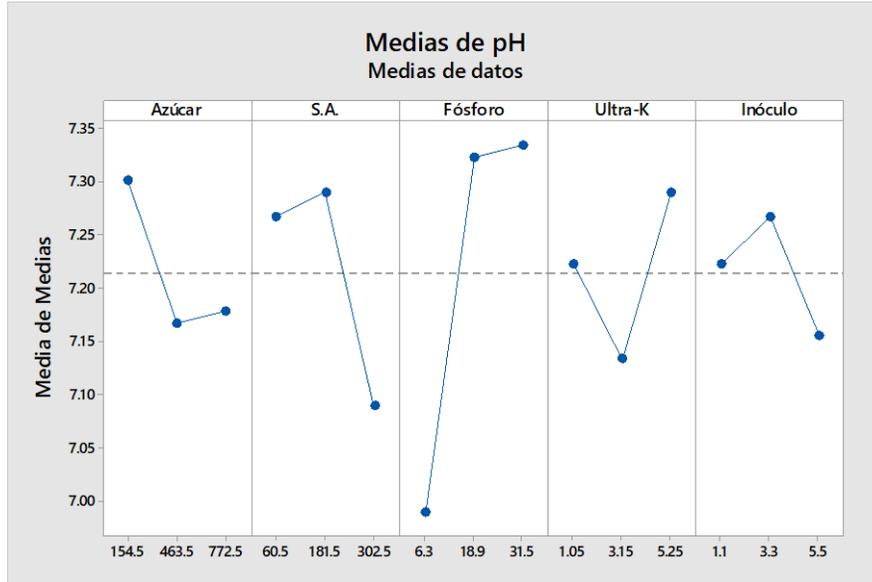
El pH se mantuvo con pocas variaciones como se puede ver en el cuadro 17, donde se observa que el valor más bajo fue de 7.4 y el valor más alto fue de 8.1, lo que nos da una media de 7.8.

**Cuadro 17. Medias del pH del primer experimento.**

L1	8.125
L2	8.15
L3	7.85
L4	8
L5	7.95
L6	7.98
L7	7.9
L8	7.95
L9	7.88
L10	8.04
L11	8
L12	7.99
L13	7.975
L14	7.98
L15	7.89
L16	7.4
L17	7.4
L18	7.7
L19	7.8
L20	7.9
L21	7.9
L22	7.6
L23	7.7
L24	7.6
L25	7.9
L26	7.6
L27	7.6
	7.842963

El azúcar en función del aumento de la cantidad fue bajando el pH, aunque no fue una bajada estrepitosa de pH. En el caso del sulfato de amonio, es una fuente de nitrógeno de reacción ácida, por lo tanto, entre los niveles bajo y medio no hubo una bajada de pH como se esperaría comúnmente, pero a diferencia del nivel bajo al nivel alto, significó una caída de pH significativa. El fósforo significó un aumento de pH en cada nivel de cantidad, llegando a 7.3. La fuente de potasio tuvo un comportamiento diferente, teniendo una bajada en el nivel medio, y una subida en el nivel alto de potasio. El inóculo tuvo una subida en el nivel medio, aunque en el nivel alto bajo. Para este experimento se obtuvo una media de 7.84 de pH.

Como se esperaba el factor que afectó más el pH fue el sulfato de amonio, ya que acidificó el pH del nivel medio al alto, caso contrario del superfosfato de calcio triple que alcalinizó el medio cuando se cambió el nivel bajo por el medio; los demás factores, no afectaron significativamente como se muestra en la figura 13.



**Figura 13. ANOVA de medias del pH del primer experimento.**

#### 6.1.4 Temperatura

Como el pH, la temperatura no tuvo gran cambio en el transcurso de la corrida, siempre se mantuvo de 16°C a 20°C. Como se observa en el cuadro 18, todas las mediciones que mostraron que no había gran cambio en ninguna de las corridas.

**Cuadro 18. Resultados de temperatura del primer experimento.**

	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
L1	18	18	19	17	17	17	17	17	18	18	18	18	18
L2	19	19	18	18	18	18	18	18	18	18	18	18	18
L3	19	18	18	18	18	18	18	18	18	18	18	18	20
L4	19	19	19	19	19	19	18	18	18	18	18	18	18
L5	19	19	19	19	19	19	18	18	18	18	18	18	18
L6	19	19	19	18	17	17	17	17	17	17	17	17	17
L7	18	18	18	17	17	17	17	17	17	17	17	17	17
L8	18	18	17	17	16	16	16	16	16	16	17	17	17
L9	18	17	17	17	17	17	17	17	17	17	18	18	18
L10	18	18	16	16	16	16	16	16	16	16	16	16	16
L11	19	18	18	18	18	18	18	18	18	18	18	18	18
L12	19	18	18	17	17	17	17	17	17	17	17	17	17
L13	18	18	18	16	16	16	16	15	16	17	17	17	17
L14	17	17	17	17	17	17	17	17	17	17	17	17	17
L15	18	18	18	18	17	17	17	17	17	17	18	18	18
L16	18	18	18	18	18	17	17	17	17	17	17	18	18
L17	18	18	17	17	17	17	17	17	17	17	17	17	17
L18	18	18	17	17	17	17	17	17	17	17	17	17	17
L19	19	18	18	18	17	17	17	17	17	17	18	18	18
L20	17	17	17	17	16	16	17	17	17	17	17	17	17
L21	18	16	16	16	16	16	16	17	17	17	17	17	17
L22	16	16	16	16	16	16	16	16	16	16	16	17	17
L23	17	17	16	16	16	16	16	16	16	16	16	16	16
L24	17	17	16	16	16	16	16	16	16	16	16	16	16
L25	16	16	16	16	16	16	16	16	16	16	16	16	16
L26	18	17	17	17	17	17	16	16	16	16	16	16	16
L27	17	17	17	16	16	16	16	16	16	16	16	16	16

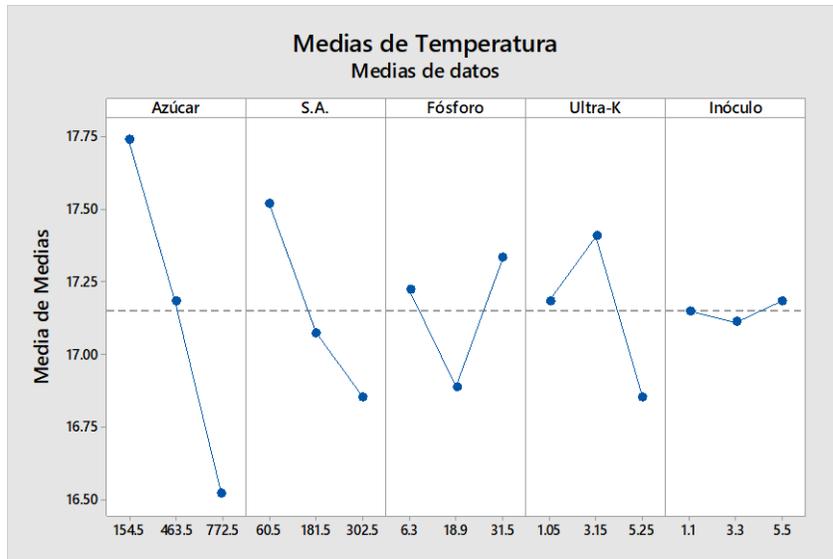
El azúcar tuvo el valor  $p$  más bajo, por lo tanto, es el factor que más influyó en la temperatura, a pesar de que la temperatura misma no tuvo gran significancia en este parámetro.

La temperatura media de este experimento fue de 18.5 °C, aunque la temperatura más baja fue de 17.3°C y la máxima fue de 19.7°C, como se muestra en el cuadro 19, no hubo grandes cambios.

**Cuadro 19. Medias de la temperatura del primer experimento.**

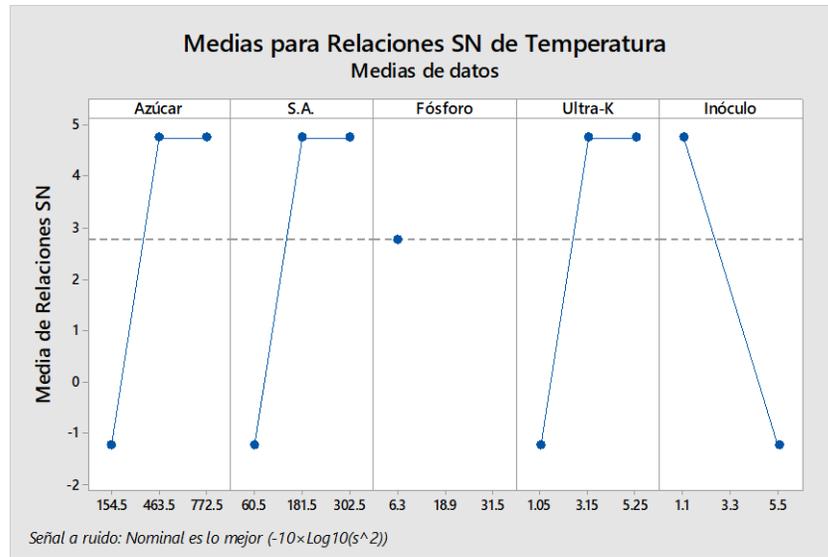
L1	19.16
L2	19.66
L3	19.75
L4	20
L5	20
L6	19
L7	18.66
L8	18.08
L9	18.75
L10	17.66
L11	19.58
L12	18.75
L13	18.08
L14	18.41
L15	19
L16	19
L17	18.58
L18	18.58
L19	19.08
L20	18.25
L21	18
L22	17.5
L23	17.5
L24	17.5
L25	17.33
L26	17.91
L27	17.58
	18.56852

El azúcar fue el que, al subir la cantidad bajó la temperatura, siendo parecido el comportamiento del medio de cultivo al subir la cantidad de sulfato de amonio, y el Ultra-K., la fuente de fósforo y el inóculo se mantuvieron cerca de la media, así que en definitiva no tuvieron incidencia en la temperatura. Como se ve en la figura 14, para este experimento se tuvo una media de 18.56 °C.



**Figura 14. ANOVA de medias de la temperatura del primer experimento.**

En la figura 15 se muestra en el ANOVA de la relación de señal/ruido, el ingrediente que mostro mayor influencia sobre la temperatura, fue el azúcar, ya que mostró, una bajada considerable de temperatura desde el nivel bajo al nivel alto, bajando casi 2 grados. Entre más azúcar, menor temperatura en el medio. El sulfato de amonio tuvo un comportamiento parecido al azúcar, debido a que, al aumentar el nivel de esta fuente de nitrógeno en el medio, bajó la temperatura.



**Figura 15. ANOVA de relaciones de señal/ruido de la temperatura del primer experimento.**

Entre más sulfato de amonio, más baja la temperatura. La fuente de fósforo mostró un comportamiento diferente, ya que el nivel bajo mostró una temperatura más alta sobre la media, el nivel medio mostró una bajada de temperatura y el nivel alto tuvo una subida de temperatura. La fuente de potasio, del nivel bajo al medio, tuvo una subida de temperatura y del nivel medio al nivel alto, tuvo una bajada de temperatura notable. Para este caso la opción que se eligió en el software Minitab para el ANOVA de la relación señal/ruido fue nominal es mejor como se muestra en el cuadro 20.

**Cuadro 20. ANOVA de relaciones señal/ruido de la temperatura del primer experimento.**

<b>Tabla de respuesta para relaciones de señal/ruido</b>					
Nominal es lo mejor (-10xLog10(s <sup>2</sup> ))					
<b>Nivel</b>	<b>Fósforo</b>	<b>S.A.</b>	<b>Ultra-K</b>	<b>Azúcar</b>	<b>Inóculo</b>
1	-1.249	-1.249	2.764	-1.249	4.771
2	4.771	4.771	*	4.771	*
3	4.771	4.771	*	4.771	-1.249
Delta	6.021	6.021	0.000	6.021	6.021
Clasificar	2.5	2.5	5	2.5	2.5

El inóculo, tuvo gran significancia ya que, en cada nivel de concentración, se mantuvo cerca de la media, aunque sí hubo un descenso de temperatura del nivel bajo al nivel medio, así como un pequeño ascenso del nivel medio al nivel alto.

## 6.2 Experimento 2

En esta fase, se tomaron los resultados del primer experimento, teniendo a grandes rasgos, que la fuente de carbono (azúcar) y la fuente de fósforo (superfosfato triple de calcio) fueron los que tuvieron gran significancia en el crecimiento bacteriano, se aplicó un diseño de 9 corridas, dejando los 3 niveles de fuentes de nutrientes ya mencionadas, y sin meter los fertilizantes restantes al diseño ya que se dejaron en un nivel para todas las corridas, ya que en los niveles que quedaron, tuvieron mayor turbidez, el sulfato de amonio se dejó en el nivel medio, el Ultra-K se dejó en el nivel bajo y el inóculo también se dejó en el nivel bajo. En este caso, las mediciones se realizaron durante 24 horas, cada hora,

midiendo los mismos parámetros, oxígeno disuelto, pH, turbidez y temperatura de los cuales se obtuvieron los siguientes resultados:

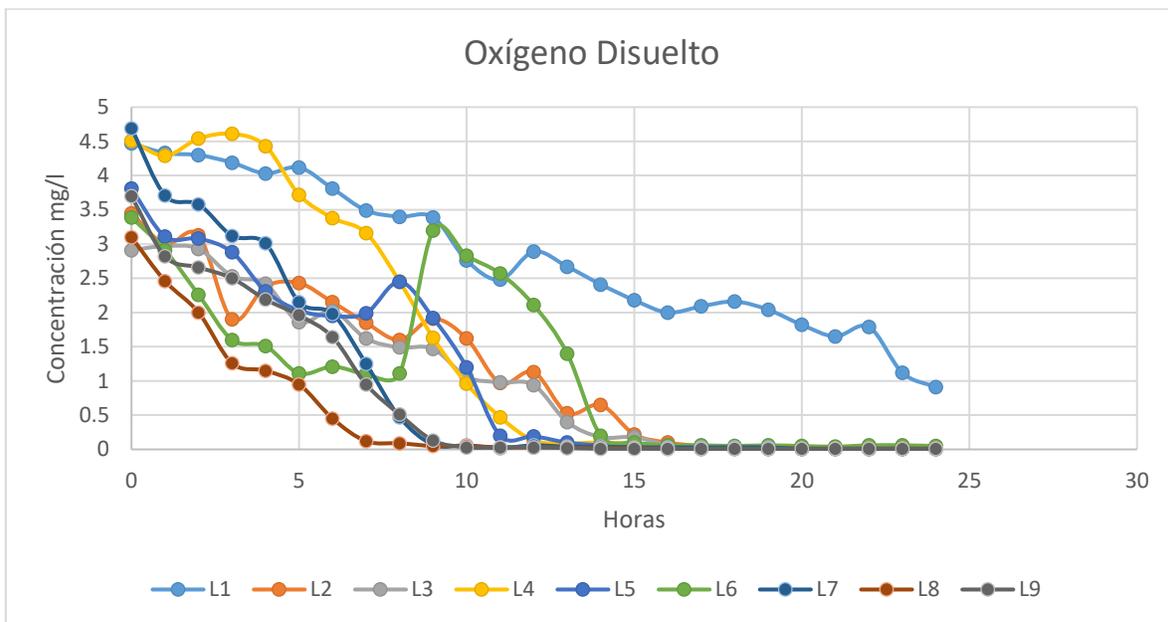
## 6.2.1 Oxígeno disuelto

La medición de oxígeno disuelto más alta fue 4.47 mg/l, y la menor fue de 0.01 mg/l, esta es la medición más baja que se puede tomar, más no significa que se haya entrado en una fase anaeróbica, las bacterias siguen creciendo, y aumentando la turbidez en cada. La relación es que, a menor oxígeno disuelto, mayor es la concentración de bacterias en el medio de cultivo, sin llegar a la fase anaeróbica. En el cuadro 21 se puede observar todas las mediciones del oxígeno disuelto.

**Cuadro 21. Resultados del oxígeno disuelto en cada corrida durante 24 horas, cada hora.**

	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24
L <sub>1</sub>	4.47	4.33	4.30	4.19	4.03	4.12	3.81	3.49	3.40	3.39	2.76	2.48	2.89	2.67	2.41	2.18	2.00	2.09	2.16	2.04	1.82	1.65	1.79	1.12	0.91
L <sub>2</sub>	3.45	3.00	3.13	1.90	2.38	2.43	2.15	1.85	1.60	1.91	1.62	0.97	1.13	0.53	0.65	0.22	0.10	0.05	0.03	0.03	0.03	0.03	0.01	0.01	0.01
L <sub>3</sub>	2.91	2.97	2.93	2.53	2.42	1.86	2.02	1.62	1.49	1.47	1.06	0.98	0.94	0.4	0.18	0.18	0.06	0.03	0.03	0.02	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01
L <sub>4</sub>	4.51	4.29	4.54	4.61	4.43	3.72	3.38	3.16	2.45	1.63	0.96	0.47	0.13	0.09	0.10	0.08	0.05	0.03	0.03	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01
L <sub>5</sub>	3.81	3.11	3.08	2.88	2.31	2.03	1.95	1.99	2.45	1.92	1.2	0.2	0.19	0.1	0.06	0.06	0.03	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01
L <sub>6</sub>	3.39	2.91	2.26	1.60	1.51	1.11	1.21	1.1	1.11	3.2	2.83	2.57	2.11	1.4	0.20	0.1	0.06	0.06	0.05	0.06	0.05	0.04	0.06	0.06	0.05
L <sub>7</sub>	4.69	3.71	3.58	3.12	3.01	2.15	1.98	1.25	0.47	0.07	0.06	0.02	0.06	0.04	0.04	0.03	0.03	0.03	0.03	0.03	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01
L <sub>8</sub>	3.1	2.46	2.00	1.26	1.15	0.95	0.45	0.12	0.09	0.05	0.05	0.03	0.03	0.03	0.02	0.02	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01
L <sub>9</sub>	3.7	2.82	2.66	2.50	2.19	1.96	1.64	0.95	0.51	0.13	0.03	0.03	0.03	0.02	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01

El análisis se mostró que, al ser un experimento industrial, el nivel de  $\alpha$  se ubicó a una alfa de 0.10, así que el azúcar y el fósforo no tuvo una significancia en el nivel de oxígeno disuelto. Así mismo, el comportamiento de oxígeno disuelto fue similar que al del experimento pasado que, al paso de las horas, el oxígeno fue disminuyendo.



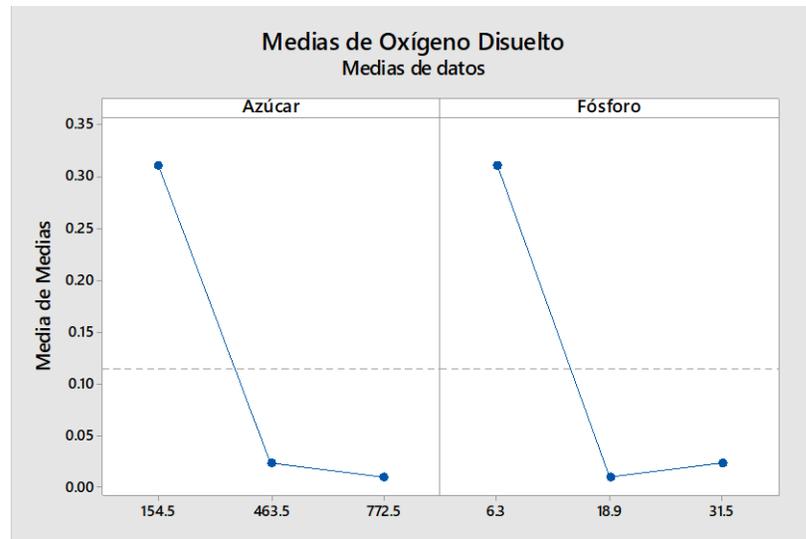
**Figura 16. Comportamiento del oxígeno disuelto del experimento 2.**

En este experimento, ninguno de los factores que se evaluaron en sus diferentes niveles fue significantes para la concentración de oxígeno disuelto como se puede ver en el cuadro 22, donde los valores estuvieron por encima del valor de significancia  $\alpha=0.10$ .

**Cuadro 22. ANOVA de medias del oxígeno disuelto del experimento 2.**

Fuentes	GL	SC Sec.	SC Ajust.	MC Ajust.	F	P
Azúcar	2	0.1724	0.1724	0.08618	0.93	0.464
Fósforo	2	0.1724	0.1724	0.08618	0.93	0.464
Error Residual	4	0.3687	0.3687	0.09218		
Total	8	0.7134				

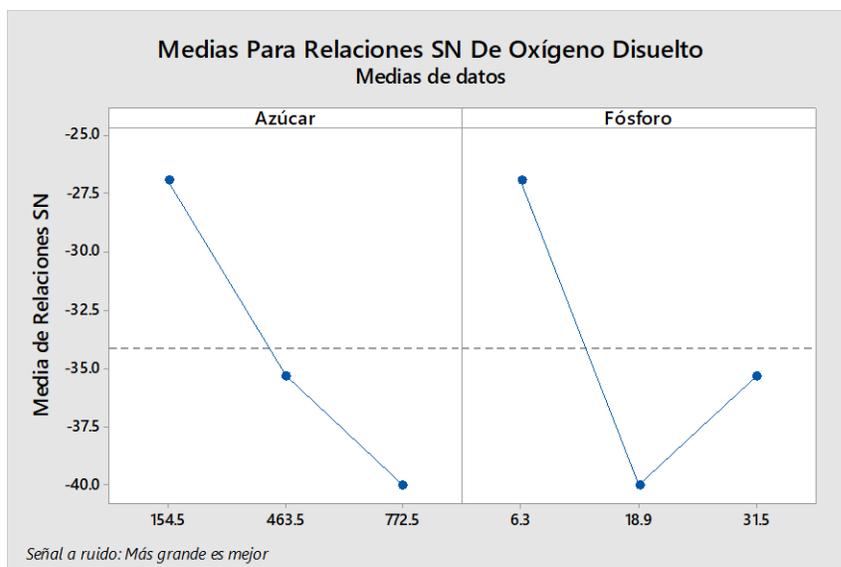
Estos resultados reflejan que a mayor cantidad de azúcar y fósforo baja el nivel del oxígeno disuelto debido al crecimiento bacteriano, entre más bacterias en el medio, mayor consumo de oxígeno y menor disponibilidad en el medio de cultivo. En la figura 17 se observa un cambio en la caída del oxígeno causada por el azúcar.



**Figura 17. ANOVA de medias del oxígeno disuelto del experimento 2.**

En las relaciones de factores señal/ruido, el nivel de significancia es de 0.10, por ser un experimento industrial, así que ambas fuentes de nutrimentos no tienen

significancia. En cuanto al fosforo, si se nota una similitud en el cuadro 17 y 18 siendo el primero del ANOVA de medias y el ANOVA de relación señal/ruido, aunque no se tuvo significancia alguna.



**Figura 18. ANOVA de relaciones de señal/ruido del oxígeno disuelto del experimento 2.**

Como se nota en el cuadro 23, ninguno de los factores fueron significantes para el oxígeno disuelto en el medio de cultivo.

**Cuadro 23. ANOVA de relaciones de señal/ruido del oxígeno disuelto del experimento 2.**

Fuente	GL	SC Sec.	SC Ajust.	MC Ajust.	F	P
Azúcar	2	262.9	262.9	131.4	0.59	0.596
Fósforo	2	262.9	262.9	131.4	0.59	0.596

Error Residual	4	890.9	890.9	222.7		
Total	8	1416.6				

En función de los datos en relaciones señal/ruido para el parámetro del oxígeno disuelto revela que se puede asegurar que el azúcar tiene una influencia directa en la concentración de oxígeno en el medio, entre más azúcar haya en el medio, menos oxígeno habrá.

## 6.2.2 Turbidez

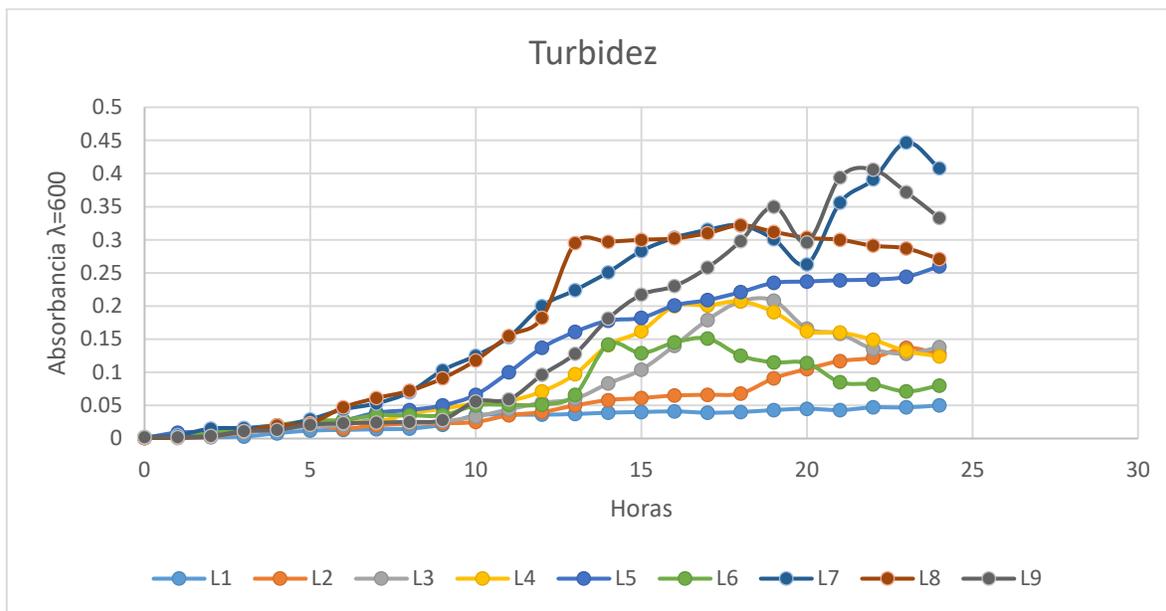
Interpretación de la turbidez en el programa Minitab, se hizo el ANOVA a las medias de los resultados y a señal/ruido usando el criterio “MÁS GRANDE MEJOR”. La turbidez más alta la obtuvo la corrida  $L_7$  a las 23 horas de fermentación, con una lectura en el espectrómetro de 0.447, aunque, se debe hacer un conteo de unidades formadoras de colonias, para ver si las bacterias no entraron en fase anaerobia.

**Cuadro 24. Resultados de turbidez del experimento 2.**

	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24
$L_1$	0.001	0.001	0.002	0.003	0.008	0.012	0.013	0.014	0.015	0.021	0.035	0.036	0.036	0.037	0.039	0.040	0.041	0.039	0.040	0.043	0.045	0.043	0.047	0.047	0.050
$L_2$	0.001	0.002	0.006	0.014	0.020	0.021	0.015	0.020	0.022	0.023	0.025	0.035	0.040	0.050	0.058	0.061	0.065	0.066	0.068	0.091	0.105	0.117	0.122	0.137	0.128
$L_3$	0.001	0.002	0.003	0.009	0.013	0.019	0.02	0.029	0.023	0.026	0.033	0.044	0.054	0.060	0.083	0.104	0.140	0.179	0.207	0.208	0.166	0.158	0.135	0.128	0.138
$L_4$	0.001	0.002	0.004	0.012	0.015	0.024	0.025	0.025	0.038	0.045	0.053	0.057	0.071	0.097	0.141	0.162	0.200	0.201	0.207	0.191	0.162	0.160	0.149	0.132	0.124
$L_5$	0.001	0.009	0.010	0.015	0.020	0.021	0.027	0.039	0.043	0.050	0.066	0.100	0.137	0.161	0.178	0.182	0.201	0.209	0.221	0.235	0.237	0.239	0.240	0.244	0.260
$L_6$	0.002	0.004	0.009	0.013	0.020	0.027	0.028	0.035	0.035	0.035	0.05	0.051	0.051	0.066	0.142	0.129	0.145	0.151	0.125	0.115	0.114	0.085	0.082	0.071	0.080
$L_7$	0.002	0.005	0.015	0.016	0.018	0.029	0.044	0.053	0.07	0.103	0.125	0.153	0.200	0.224	0.251	0.283	0.303	0.315	0.322	0.301	0.263	0.356	0.391	0.447	0.408
$L_8$	0.001	0.001	0.003	0.011	0.020	0.023	0.047	0.061	0.072	0.091	0.118	0.155	0.182	0.295	0.297	0.300	0.302	0.31	0.322	0.312	0.303	0.300	0.291	0.287	0.271
$L_9$	0.002	0.002	0.004	0.011	0.013	0.021	0.23	0.240	0.025	0.028	0.056	0.059	0.096	0.128	0.181	0.217	0.230	0.258	0.298	0.35	0.296	0.394	0.406	0.372	0.333

En función de los resultados del primer experimento, el azúcar es uno de los factores que más significancia tienen en el aumento de la turbidez; teniendo un  $\alpha$  cercano a 0.05, aunque por ser un experimento de aplicación industrial, se optó por aumentar el  $\alpha=0.10$ .

La tendencia de la turbidez es el aumento al paso de las horas de fermentación como se puede observar en la figura 19, donde la mayor turbidez se tuvo a las 11 horas por la corrida L7.



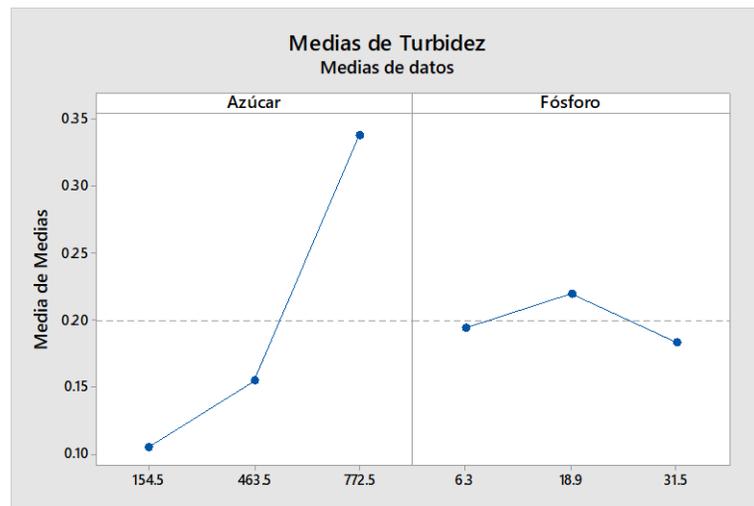
**Figura 19. Comportamiento de la turbidez del experimento 2.**

En el caso del fósforo tuvo una significancia menor a  $\alpha=0.10$  por lo tanto también influyó en el crecimiento bacteriano. El resto de los factores, como demostraron desde el primer experimento poca significancia en la concentración de bacterias, siguieron igual, debido a que en este experimento también el sulfato de amonio, el Ultra-K y el inóculo, se mantuvieron sin gran influencia. En este experimento el azúcar si tuvo significancia al afectar positivamente el crecimiento bacteriano, teniendo el valor de  $p$  por debajo de  $\alpha=0.10$ , como se muestra en el cuadro 25.

**Cuadro 25. ANOVA de medias de la turbidez del experimento 2.**

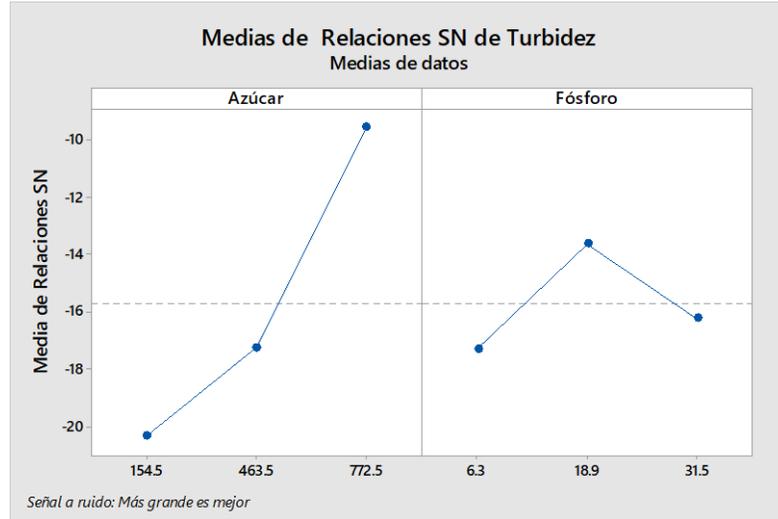
Fuente	GL	SC Sec.	SC Ajust.	MC Ajust.	F	P
Azúcar	2	0.089625	0.089625	0.044812	6.05	0.062
Fósforo	2	0.002062	0.002062	0.001031	0.14	0.874
Error Residual	4	0.029604	0.029604	0.007401		
Total	8	0.121291				

En este caso, el análisis estadístico, evidenció que el azúcar es el principal implicado en el aumento en las mediciones de turbidez, ya que hay mayor cantidad de bacterias en el medio. El superfosfato triple de calcio se mantuvo cerca de la media, es por eso por lo que no tuvo gran significancia como se puede observar en la figura 20.



**Figura 20. ANOVA de medias de la turbidez del experimento 2.**

En la figura 21 se muestra la señal/ruido se obtuvo que el nivel más alto de azúcar tuvo significancia en el crecimiento bacteriano, aunque se pasó con una décima del  $\alpha=0.10$



**Figura 21. ANOVA de relaciones señal/ruido de la turbidez experimento 2.**

El fósforo mostró baja significancia en comparación con los otros niveles. Como ya se mencionó, los demás factores no tuvieron significancia por lo tanto se dejaron en los niveles con más alta influencia en la turbidez como se demuestra en el cuadro 26.

**Cuadro 26. ANOVA de relaciones de señal/ruido de la turbidez del experimento 2.**

Fuente	GL	SC Sec.	SC Ajust.	MC Ajust.	F	P
Azúcar	2	185.52	185.52	92.76	4.28	0.101
Fósforo	2	21.47	21.47	10.73	0.50	0.642
Error Residual	4	86.68	86.68	21.67		
Total	8	293.67				

Como recomendación para este caso, tenemos que el azúcar en el nivel alto de azúcar es que más afecta a la turbidez, es por eso por lo que se recomienda agregar 772.5 gr/50lt en el medio de cultivo. El super fosfato de calcio triple, no afectó al crecimiento como el azúcar, por lo tanto, se recomienda usar el nivel bajo 6.3 gr/50lt, de fosforo en el medio de cultivo para economizar el caldo de cultivo, en combinación con el nivel medio de sulfato de amonio, que se dejó en ese nivel al no mostrar significancia desde el primer experimento, por lo tanto, se recomienda agregar 181.5 gr/50lt de sulfato de amonio. En el caso similar del Ultra -K que se dejó en el nivel bajo, por esta razón se recomienda agregar 1.05 gr/50lt. Así como el Serenade se dejó en el nivel bajo, es por esto por lo que se recomienda usar el nivel bajo, 1.1 gr/50lt; en el cuadro 27 se muestra la formula completa del experimento 2.

**Cuadro 27. Recomendación de la fórmula del experimento 2.**

Azúcar	772.5 gr
Super Fosfato de Calcio Triple	6.3 gr
Sulfato de Amonio	181.5 gr
Ultra-K	1.05 gr
Serenade	1.1 gr

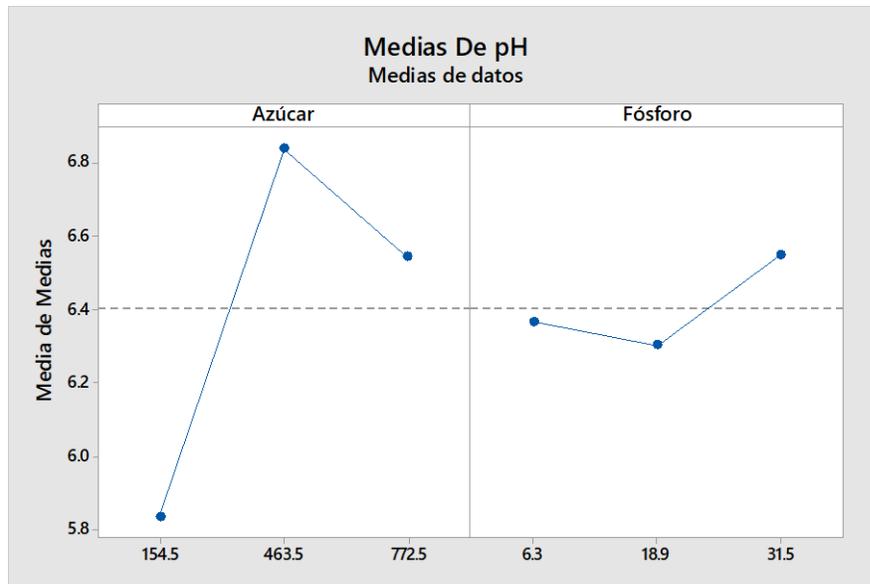
### 6.2.3 pH

Se mantuvo cerca de la media, es por eso por lo que no tuvo gran significancia en el crecimiento bacteriano, aunque en el análisis específico de esta variante se notó que, en el nivel medio de azúcar, tuvo un ligero aumento y el fósforo se mantuvo relativamente en la misma cantidad. Se obtuvo una media de 7.31. En el cuadro 28 se tienen las mediciones del pH de este experimento.

**Cuadro 28. Resultados del pH del experimento 2.**

	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24
L <sub>1</sub>	7.05	7.09	7.11	7.15	7.22	7.39	7.45	7.46	7.52	7.51	7.52	7.55	7.54	7.53	7.54	7.51	7.51	7.53	7.56	7.52	7.50	7.43	7.39	7.31	7.29
L <sub>2</sub>	7.09	7.25	7.35	7.42	7.47	7.49	7.53	7.52	7.51	7.51	7.47	7.46	7.39	7.30	7.17	7.00	6.89	6.80	6.72	5.66	5.40	5.38	5.35	5.01	5.00
L <sub>3</sub>	7.15	7.15	7.12	7.12	7.13	7.13	7.1	7.09	6.92	6.9	6.88	6.88	6.87	6.89	6.87	6.72	6.71	6.76	6.5	6.22	6.21	6.01	5.92	5.67	5.22
L <sub>4</sub>	7.18	7.18	7.17	7.16	7.16	7.15	7.15	7.14	7.14	7.14	7.13	7.13	7.13	7.13	7.10	7.10	7.00	7.00	7.00	7.00	6.90	6.90	6.80	6.80	6.80
L <sub>5</sub>	7.42	7.31	7.3	7.29	7.28	7.26	7.22	7.21	7.2	7.2	7.1	7	7	6.98	6.71	6.70	6.70	6.70	6.68	6.67	6.67	6.53	6.53	6.50	6.49
L <sub>6</sub>	7.7	7.41	7.32	7.31	7.3	7.3	7.3	7.31	7.28	7.28	7.27	7.27	7.27	7.26	7.26	7.25	7.25	7.25	7.24	7.24	7.23	7.26	7.25	7.24	7.23
L <sub>7</sub>	7.36	7.23	7.23	7.27	7.22	7.22	7.22	7.34	7.26	6.98	6.8	6.28	6.21	5.38	5.08	5.09	5.10	5.08	5.06	5.05	5.03	5.06	5.03	5.01	5.01
L <sub>8</sub>	7.75	7.73	7.71	7.71	7.68	7.66	7.58	7.58	7.57	7.51	7.5	7.5	7.49	7.48	7.48	7.48	7.47	7.46	7.46	7.45	7.45	7.44	7.43	7.43	7.42
L <sub>9</sub>	7.45	7.45	7.48	7.51	7.51	7.49	7.5	7.49	7.48	7.4	7.41	7.39	7.37	7.35	7.34	7.34	7.32	7.31	7.30	7.29	7.28	7.26	7.25	7.24	7.20

Al dejar el nivel del sulfato de amonio en el medio para todas las corridas, debido a que no tuvo mucha significancia, no cambió. Tampoco hubo cambios significativos en cuanto el azúcar y el superfosfato de calcio triple, mantuvieron el comportamiento de no afectar tampoco al pH en gran medida como se muestra en la figura 22.



**Figura 22. ANOVA del pH del experimento 2.**

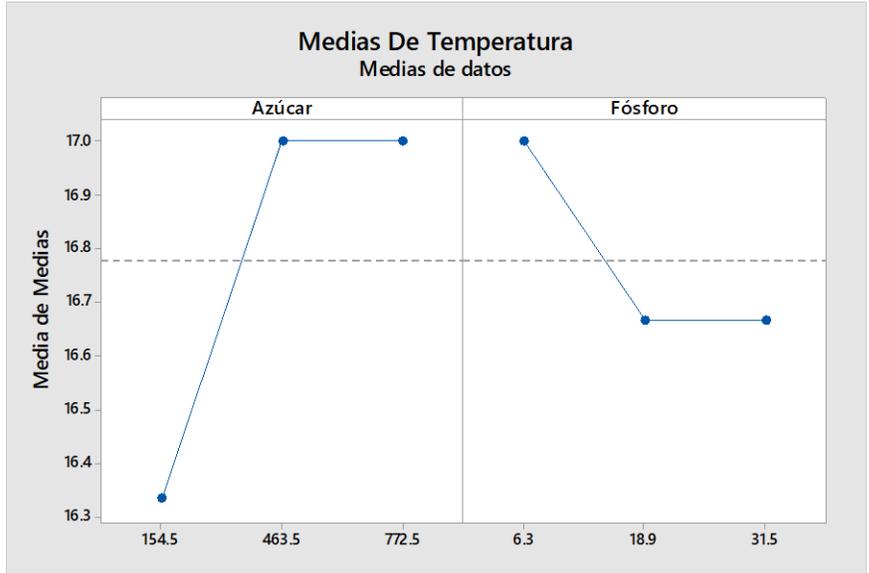
#### 6.2.4 Temperatura

Aunque la temperatura ambiental bajó un poco, la temperatura del medio de cultivo aumento en función de la cantidad de azúcar, esto debido a que, según los experimentos pasados, entre más azúcar, más crecimiento bacteriano por lo tanto la temperatura aumenta; en el caso del fósforo, entre más contenía el medio de cultivo, más bajaba la temperatura. Las mediciones de la temperatura de todo el experimento se muestran en el cuadro 29.

**Cuadro 29. Resultados de temperatura del experimento 2.**

	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24
L <sub>1</sub>	18	18	17	16	16	16	16	16	16	16	16	16	16	16	16	16	16	16	16	16	16	16	16	16	16
L <sub>2</sub>	17	17	17	16	16	16	16	16	16	16	16	16	16	16	16	16	16	16	16	16	16	16	16	16	16
L <sub>3</sub>	16	16	16	15	15	15	15	15	15	16	16	16	16	17	17	18	17	17	17	17	17	17	17	17	17
L <sub>4</sub>	17	17	16	16	16	16	16	16	16	16	16	17	17	17	17	17	17	17	17	17	17	17	17	17	17
L <sub>5</sub>	18	18	18	17	17	16	16	16	16	15	16	16	17	17	17	17	17	17	17	17	17	17	17	17	17
L <sub>6</sub>	16	16	16	16	16	16	16	16	16	16	16	16	16	17	17	17	17	17	17	17	17	17	17	17	17
L <sub>7</sub>	17	17	17	17	17	17	17	17	17	17	17	17	17	17	18	18	18	18	18	18	18	18	18	18	18
L <sub>8</sub>	17	17	17	17	17	17	17	17	17	17	17	17	17	17	17	17	17	17	17	17	17	17	17	17	17
L <sub>9</sub>	17	17	17	15	15	15	15	16	16	16	16	16	16	16	16	16	16	16	16	16	16	16	16	16	16

La temperatura no tuvo grandes cambios, siempre se mantuvo cerca de la media, como se puede observar en la figura 23 aunque el nivel medio y alto de la azúcar y el nivel bajo del fósforo fueron los que subieron un poco la temperatura.



**Figura 23. ANOVA de medias de la temperatura del experimento 2.**

### 6.3 Experimento 3

Debido a que no se notaron resultados convincentes, se repitió el experimento 2, los mismos niveles de nutrimentos, las mediciones todo fue igual, pero con mediciones solo por 12 horas cada hora.

En este experimento, la temperatura del ambiente bajó, por lo cual, la temperatura del agua bajó considerablemente hasta 4 grados, debido a esto, la turbidez se vio afectada.

### 6.3.1 Oxígeno disuelto

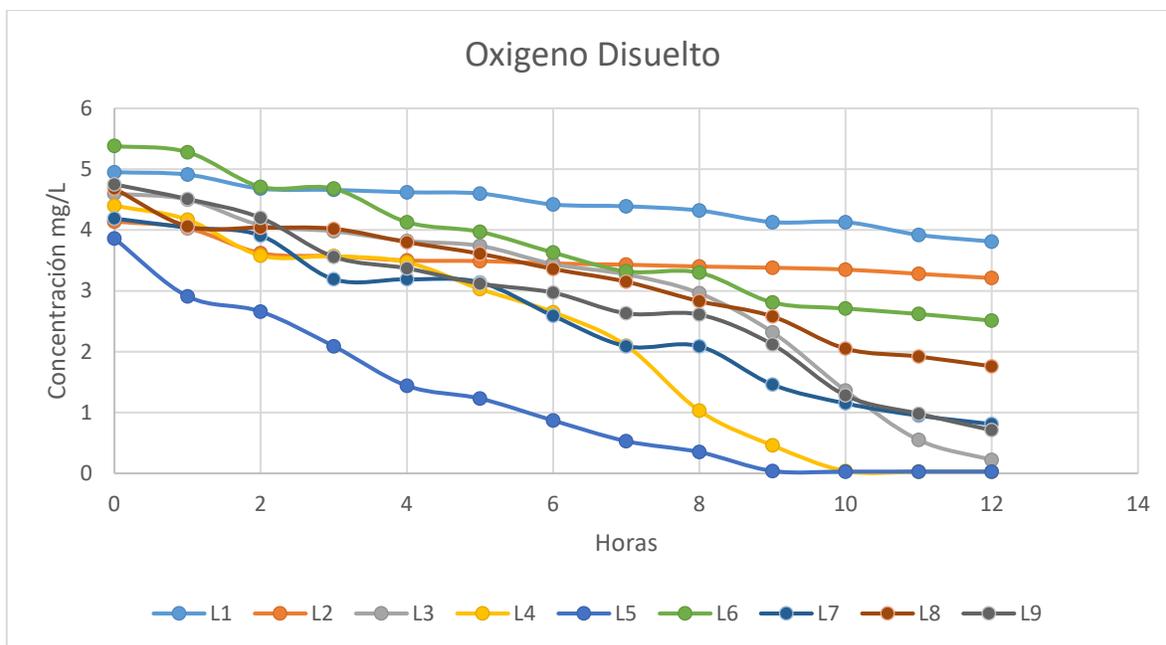
En el caso del oxígeno disuelto, el nivel de fósforo fue el que tuvo la mayor significancia en el nivel de oxígeno en el medio, el nivel menor de fósforo mostró que se tenía el nivel más alto de oxígeno. En contraste, el nivel medio fue el que provocó la mayor bajada en la concentración de oxígeno en el medio. En el cuadro 30 están las mediciones del oxígeno de este experimento.

**Cuadro 30. Resultados del oxígeno disuelto del experimento 3.**

	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
L <sub>1</sub>	4.95	4.91	4.68	4.66	4.62	4.6	4.42	4.39	4.32	4.13	4.13	3.92	3.81
L <sub>2</sub>	4.14	4.03	3.62	3.57	3.5	3.49	3.45	3.43	3.40	3.38	3.35	3.28	3.21
L <sub>3</sub>	4.6	4.50	4.08	3.98	3.82	3.74	3.44	3.27	2.96	2.32	1.36	0.55	0.22
L <sub>4</sub>	4.4	4.17	3.58	3.57	3.47	3.03	2.65	2.1	1.03	0.46	0.04	0.03	0.03
L <sub>5</sub>	3.86	2.91	2.66	2.09	1.44	1.23	0.87	0.53	0.35	0.04	0.03	0.03	0.03
L <sub>6</sub>	5.38	5.28	4.71	4.68	4.13	3.97	3.63	3.32	3.30	2.81	2.71	2.62	2.51
L <sub>7</sub>	4.19	4.04	3.91	3.19	3.19	3.14	2.59	2.09	2.09	1.46	1.15	0.95	0.81
L <sub>8</sub>	4.68	4.06	4.04	4.02	3.8	3.61	3.36	3.15	2.83	2.58	2.05	1.92	1.76
L <sub>9</sub>	4.75	4.51	4.20	3.56	3.37	3.12	2.97	2.63	2.61	2.12	1.28	0.98	0.71

Al ser un proyecto de aplicación industrial, el nivel de significancia se cambió a 0.10, debido a esto, el azúcar y el superfosfato triple de calcio están dentro de los parámetros para denotar que si influyeron en los niveles de oxígeno disuelto.

El comportamiento del crecimiento bacteriano fue similar al del experimento pasado, se sigue la misma tendencia al aumento de la turbidez conforme pasan las horas de fermentación como se puede ver en la figura 24.



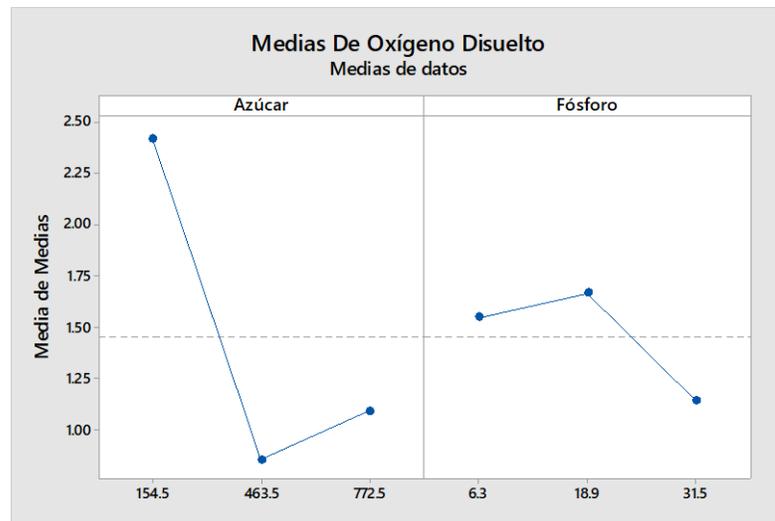
**Figura 24. Comportamiento del oxígeno disuelto del experimento 3.**

En el cuadro 31 se observó que nuevamente ninguno de los factores tuvo significancia en el oxígeno. Aunque en la figura 24 se muestra como bajó al paso de las horas de fermentación.

**Cuadro 31. ANOVA de medias del oxígeno disuelto del experimento 3.**

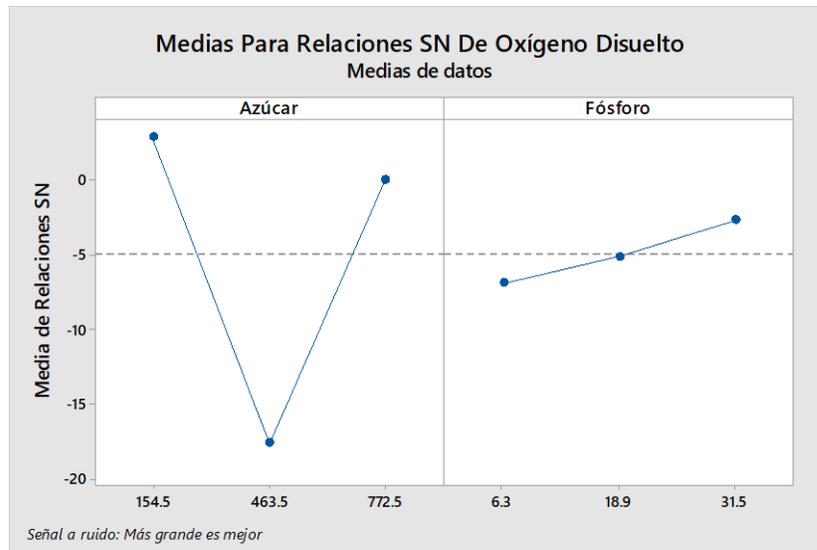
Fuente	GL	SC Sec.	SC Ajust.	MC Ajust.	F	$p$
Fósforo	2	4.2216	4.2216	0.2233	0.72	0.541
Azúcar	2	0.4467	0.4467	0.2233	0.08	0.928
Error residual	4	11.7213	11.7213	2.9303		
Total	8	16.3896				

El nivel medio y alto de azúcar fueron los que tuvieron una significancia en la bajada de la concentración del oxígeno disuelto, siendo que, en este experimento el nivel alto de fósforo fue el que bajó más el oxígeno como se muestra en la figura 25.



**Figura 25. ANOVA de medias del oxígeno disuelto del experimento 3.**

En el caso de señal/ruido (figura 26), se tiene la certeza de que el nivel bajo de fósforo es el que baja más el nivel del oxígeno disuelto en el medio; el nivel medio tuvo la significancia menor, así que no se está seguro de que en realidad baje el oxígeno con este nivel.



**Figura 26. ANOVA de relaciones de señal/ruido del oxígeno disuelto del experimento 3.**

El nivel alto de fósforo mostró también una alta significancia en que es de los dos niveles que más baja el oxígeno. Se confirma que los factores no tuvieron influencia en el oxígeno disuelto como se observa en el cuadro 32.

**Cuadro 32. ANOVA de relaciones de señal/ruido del oxígeno disuelto del experimento 3.**

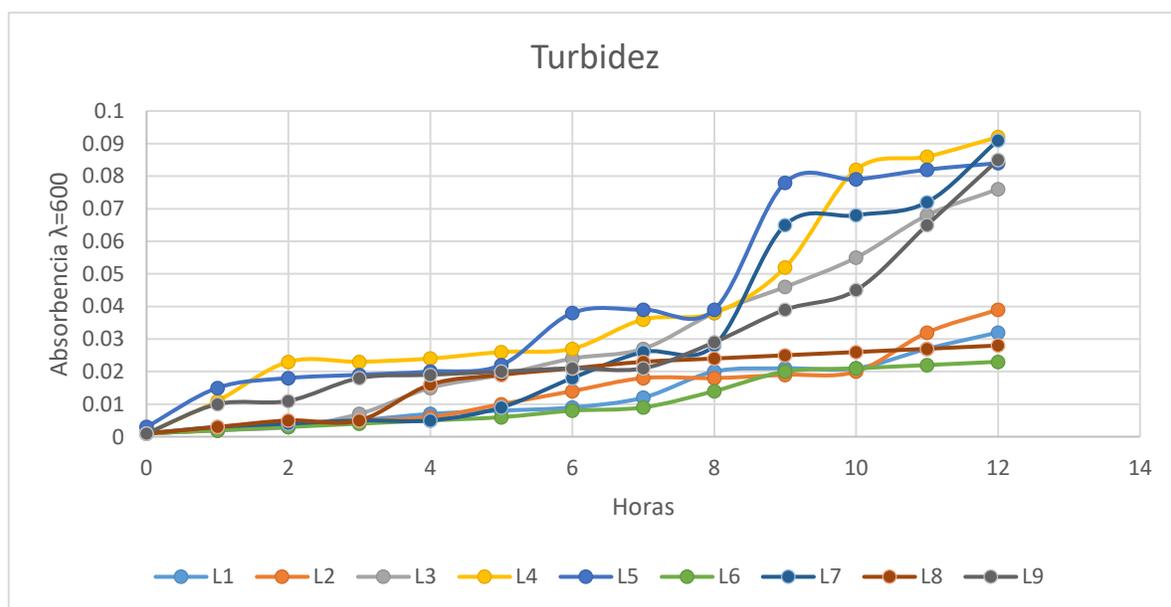
Fuente	GL	SC Sec.	SC Ajust.	MC Ajust.	F	P
Fósforo	2	740.95	740.95	370.47	1.07	0.424
Azúcar	2	26.42	26.42	13.21	0.04	0.963
Error Residual	4	1381.47	1381.47	345.37		
Total	8	2148.84				

El fósforo no tuvo significancia, ya que los tres niveles se mantuvieron cerca de la media. El azúcar, el nivel bajo y alto tuvieron una señal/ruido grande, así que estos niveles son los que influyen en el oxígeno disuelto.

### 6.3.2 Turbidez

Para la turbidez, el nivel alto de fósforo fue el que tuvo el menor aumento de la turbidez, siendo esto, que entre menor sea el nivel del fósforo en el medio, menor será el crecimiento bacteriano, teniendo la mayor significancia de los tres niveles de fósforo en el alto.

La tendencia es el aumento en todos los experimentos de bacterias en el medio, como se muestra en la figura 27, en la hora 12, se puede notar que la mayoría de las corridas llegan casi al mismo punto, aunque solo la mitad aumenten de esa manera, las demás corridas se quedaron muy por debajo a comparación la L4, L5, L7, L9 y L3.



**Figura 27. Comportamiento de la turbidez del experimento 3.**

La lectura más baja fue de 0.001 y la más alta fue de 0.091 a las 12 horas de fermentación (cuadro 33). En todas las corridas, las lecturas más altas se suscitaron a las 12 horas, caso contrario en los experimentos pasados que las lecturas más altas salían a las 11 horas.

**Cuadro 33. Resultados de la turbidez del experimento 3.**

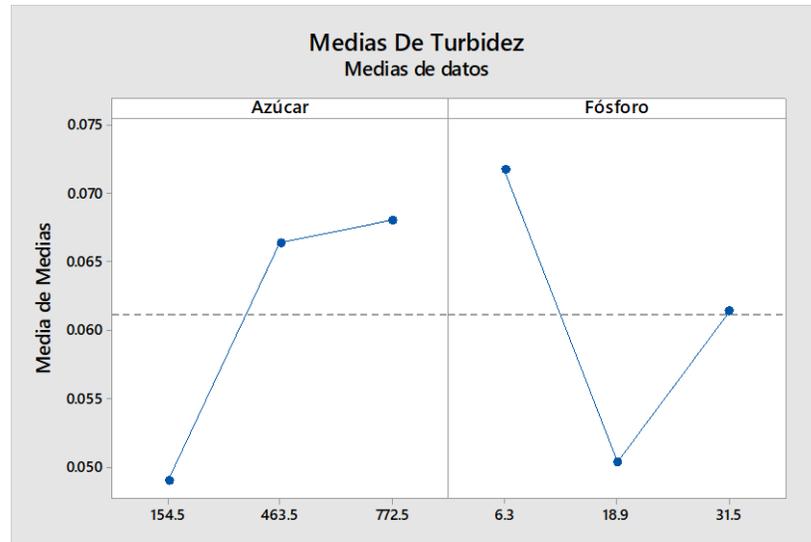
	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
L <sub>1</sub>	0.001	0.002	0.003	0.005	0.007	0.008	0.009	0.012	0.02	0.021	0.021	0.027	0.032
L <sub>2</sub>	0.001	0.002	0.004	0.005	0.006	0.01	0.014	0.018	0.018	0.019	0.02	0.032	0.039
L <sub>3</sub>	0.001	0.002	0.003	0.007	0.015	0.019	0.024	0.027	0.038	0.046	0.055	0.068	0.076
L <sub>4</sub>	0.001	0.011	0.023	0.023	0.024	0.026	0.027	0.036	0.038	0.052	0.082	0.086	0.092
L <sub>5</sub>	0.003	0.015	0.018	0.019	0.020	0.022	0.038	0.039	0.039	0.078	0.079	0.082	0.084
L <sub>6</sub>	0.001	0.002	0.003	0.004	0.005	0.006	0.008	0.009	0.014	0.020	0.021	0.022	0.023
L <sub>7</sub>	0.001	0.003	0.004	0.005	0.005	0.009	0.018	0.026	0.028	0.065	0.068	0.072	0.091
L <sub>8</sub>	0.001	0.003	0.005	0.005	0.016	0.019	0.021	0.023	0.024	0.025	0.026	0.027	0.028
L <sub>9</sub>	0.001	0.010	0.011	0.018	0.019	0.020	0.021	0.021	0.029	0.039	0.045	0.065	0.085

El análisis de varianza de la turbidez (cuadro 34) muestra que ninguno de los factores fue significativo, ninguno afecta positivamente en el aumento de bacterias en el medio debido que están por encima del valor de significancia.

**Cuadro 34. ANOVA de medias de la turbidez del experimento 3.**

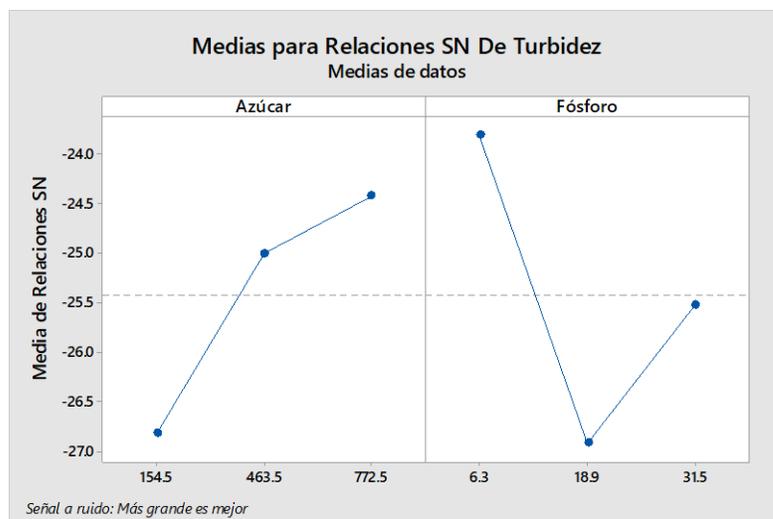
Fuente	GL	SC Sec.	SC Ajust.	MC Ajust.	F	P
Fósforo	2	0.000664	0.000664	0.000332	0.23	0.802
Azúcar	2	0.000683	0.000683	0.000341	0.24	0.798
Error residual	4	0.005702	0.005702	0.001425		
Total	8	0.007049				

El azúcar en el nivel alto fue el que subió más la turbidez, es el comportamiento que se observó desde el primer experimento. En el caso del superfosfato triple de calcio, también se comportó como en el primer experimento, el nivel bajo fue el que causó la subida de la turbidez como se muestra en la figura 28.



**Figura 28. ANOVA de medias de la turbidez del experimento 3.**

Existe una similitud entre las figuras 28 y 29, la primera es el ANOVA de medias y la segunda es el ANOVA de relaciones de señal/ruido, por lo tanto, coincide que a pesar de que no hubo significancia, el nivel alto afecta positivamente a la turbidez, así como el, nivel bajo de fosforo. Cabe mencionar que la temperatura del ambiente bajó en promedio 4 grados, por ende, la turbidez se vio afectada por la temperatura del agua.



**Figura 29. ANOVA de relaciones de señal/ruido de la turbidez del experimento 3.**

Se tuvieron valores p mayores que 0.10 así que no se cumple con los valores necesarios para determinar que estos factores influyen el crecimiento bacteriano como se muestra en el cuadro 35.

**Cuadro 35. ANOVA de relaciones de señal/ruido de la turbidez del experimento 3.**

Fuente	GL	SC Sec.	SC Ajust.	MC Ajust.	F	P
Azúcar	2	9.349	9.349	4.675	0.11	0.900
Fósforo	2	14.493	14.493	7.246	0.17	0.852
Error Residual	4	173.299	173.299	43.325		
Total	8	197.141				

No se obtuvieron datos confiables en el experimento 2, ya que en el experimento pasado se obtuvieron lecturas muy por fuera de la curva de crecimiento bacteriano normal, había lecturas muy altas y justo en la siguiente medición, arrojaba lecturas muy bajas.

Como recomendación para este experimento, resulta parecido al experimento pasado, la cantidad recomendada en función del resultado del ANOVA para el azúcar es de 772.5 gr/50lt ya que según el gráfico es el que más aumenta la cantidad de bacterias en el medio. El superfosfato de calcio triple, en su nivel bajo es el que más influye en la turbidez, aunado al nivel medio de sulfato de amonio, 181.5 gr/50lt, el nivel bajo de Ultra-K 1.05 gr/50lt, y el nivel bajo de Serenade 1.1 gr/50lt. En el cuadro 36 se muestra la formula del experimento 3.

**Cuadro 36. Recomendación de la fórmula del experimento 3.**

Azúcar	772.5 gr
Super Fosfato de Calcio Triple	6.3 gr
Sulfato de Amonio	181.5 gr
Ultra-K	1.05 gr
Serenade	1.1 gr

### 6.3.3 pH

El pH permaneció igual sin cambios significantes, aunque tuvo una ligera bajada en el nivel medio de azúcar y volvió a subir en el nivel alto; en el caso del fósforo, el nivel medio fue el que subió más el pH. La lectura más baja fue de 6.86 y la más alta fue de 7.64 (cuadro 37).

**Cuadro 37. Resultados del pH del experimento 3.**

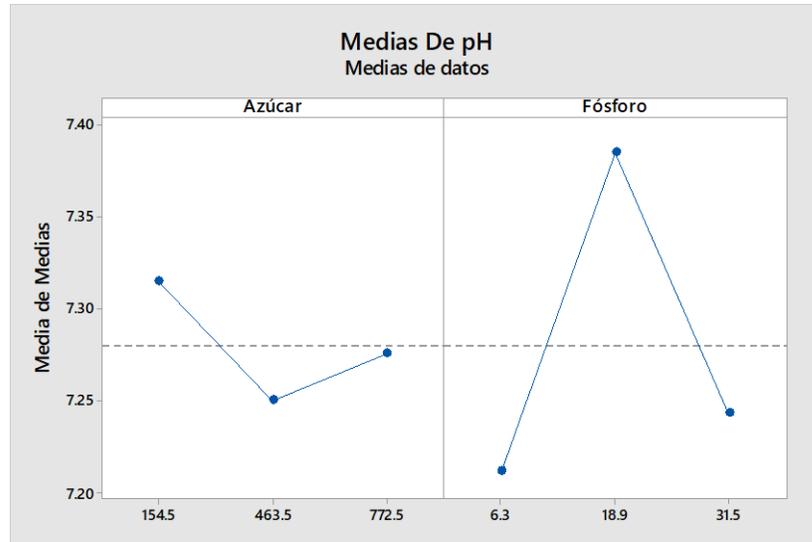
	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
L <sub>1</sub>	7.62	7.61	7.6	7.6	7.56	7.56	7.55	7.52	7.5	7.41	7.41	7.38	7.37
L <sub>2</sub>	7.42	7.41	7.38	7.37	7.37	7.36	7.35	7.35	7.34	7.34	7.31	7.3	7.28
L <sub>3</sub>	7.42	7.41	7.4	7.39	7.39	7.38	7.35	7.34	7.32	7.3	7.29	7.25	7.24
L <sub>4</sub>	7.49	7.45	7.43	7.43	7.42	7.41	7.35	7.33	7.22	7.07	7.01	7.01	6.86
L <sub>5</sub>	7.63	7.61	7.58	7.57	7.55	7.55	7.54	7.53	7.52	7.52	7.51	7.5	7.48
L <sub>6</sub>	7.84	7.72	7.68	7.67	7.66	7.66	7.65	7.64	7.64	7.31	7.3	7.29	7.29
L <sub>7</sub>	7.41	7.41	7.39	7.38	7.37	7.36	7.35	7.35	7.34	7.31	7.31	7.29	7.27
L <sub>8</sub>	7.58	7.53	7.49	7.47	7.45	7.44	7.43	7.41	7.41	7.39	7.37	7.36	7.35
L <sub>9</sub>	7.58	7.57	7.56	7.49	7.49	7.48	7.22	7.21	7.2	7.19	7.18	7.18	7.17

No hubo ninguna significancia en los factores evaluados, ni el fósforo ni el azúcar afectaron el pH, aunque en este caso, el azúcar se mantuvo cerca de la media, mientras que el fósforo en su nivel medio si afectó el pH (cuadro 38).

**Cuadro 38. ANOVA de medias del pH del experimento 3.**

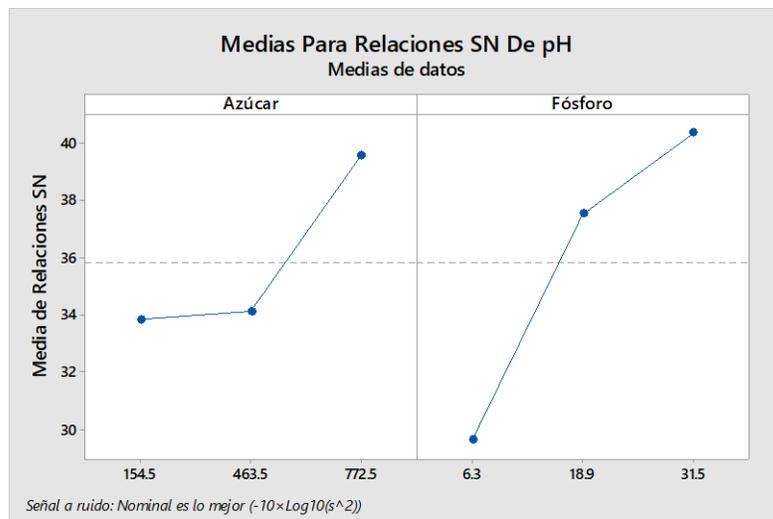
Fuente	GL	SC Sec.	SC Ajust.	MC Ajust.	F	P
Azúcar	2	0.006319	0.006319	0.003159	0.10	0.904
Fósforo	2	0.050541	0.050541	0.025270	0.83	0.500
Error Residual	4	0.121896	0.121896	0.030474		
Total	8	0.178756				

Al ser un factor que no tuvo significancia en el crecimiento bacteriano, se denota que el azúcar se mantuvo cerca de la media, por lo tanto, no afecta tanto el pH (figura 30); pero en el caso del superfosfato triple de calcio, el nivel medio, subió el pH, en contraste con el nivel bajo y el nivel alto.



**Figura 30. ANOVA de medias del pH del experimento 3.**

Se notó una gran influencia de los componentes del medio de cultivo sobre el pH ya que, a mayor cantidad, los dos suben el pH como se muestra en la figura 31. El nivel alto de azúcar y al nivel alto de superfosfato de calcio triple fueron los que aumentaron más el pH.



**Figura 31. ANOVA de relaciones de señal/ruido del pH del experimento 3.**

Se tiene la certeza de que ambos de los factores analizados inciden en el comportamiento del pH (cuadro 39) siendo que a mayor cantidad de superfosfato triple de calcio baja más el pH; mismo efecto que tiene el azúcar, a mayor cantidad, más baja el pH.

**Cuadro 39. ANOVA de relaciones de señal/ruido del pH del experimento**

**3.**

Fuente	GL	SC Sec.	SC Ajust.	MC Ajust.	F	P
Azúcar	2	63.06	63.06	31.53	0.75	0.528
Fósforo	2	186.19	186.19	93.10	2.22	0.225
Error Residual	4	167.68	167.68	41.92		
Total	8	416.94				

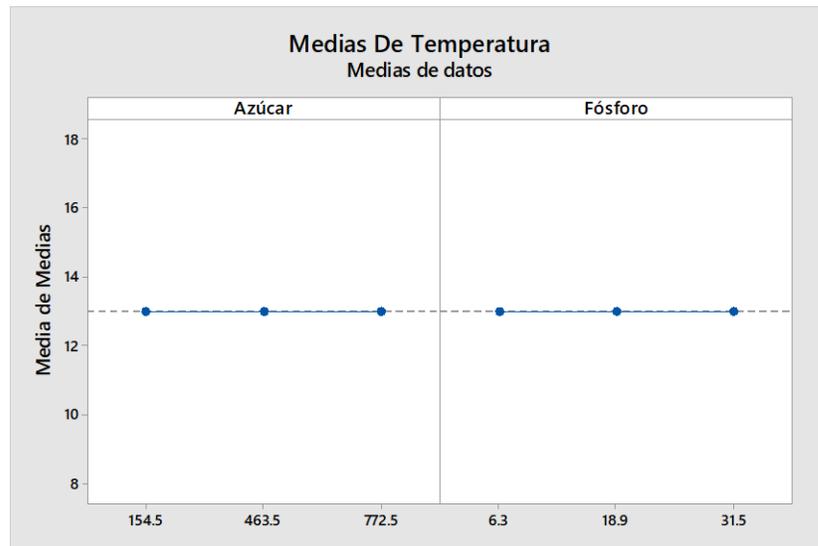
#### 6.3.4 Temperatura

En las últimas lecturas, no se mostró cambio alguno, ni subidas ni bajas de temperatura, lo que explica el comportamiento del crecimiento bacteriano al no presentar abruptas subidas o bajadas de temperatura, teniendo un aumento sostenido de bacterias contenidas en el medio. En el cuadro 40 se muestran las lecturas que estuvieron en 13°C y 14°C.

**Cuadro 40. Resultados de la temperatura del experimento 3.**

	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
L <sub>1</sub>	14	14	14	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13
L <sub>2</sub>	14	14	14	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13
L <sub>3</sub>	14	14	14	14	13	13	13	13	13	13	13	13	13
L <sub>4</sub>	14	14	14	14	14	14	14	14	13	13	13	13	13
L <sub>5</sub>	14	14	14	14	14	14	14	14	13	13	13	13	13
L <sub>6</sub>	14	14	14	14	14	14	14	14	13	13	13	13	13
L <sub>7</sub>	14	14	14	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13
L <sub>8</sub>	14	14	14	14	14	14	13	13	13	13	13	13	13
L <sub>9</sub>	15	14	14	14	14	14	14	14	13	13	13	13	13

Debido a que las mediciones de temperatura salieron casi iguales, la mayoría salieron en 13°C. es por eso por lo que en la figura 32 no se vio ningún cambio en los tres niveles de cada factor.



**Figura 32. ANOVA de relaciones señal/ruido de la temperatura del experimento 3.**

#### 6.4 Experimento 4

En este experimento, se repitió el diseño del primer experimento, un L<sub>27</sub> en el cual, la fuente de carbono se cambió, el azúcar por melaza, haciendo las mediciones cada hora, durante 12 horas.

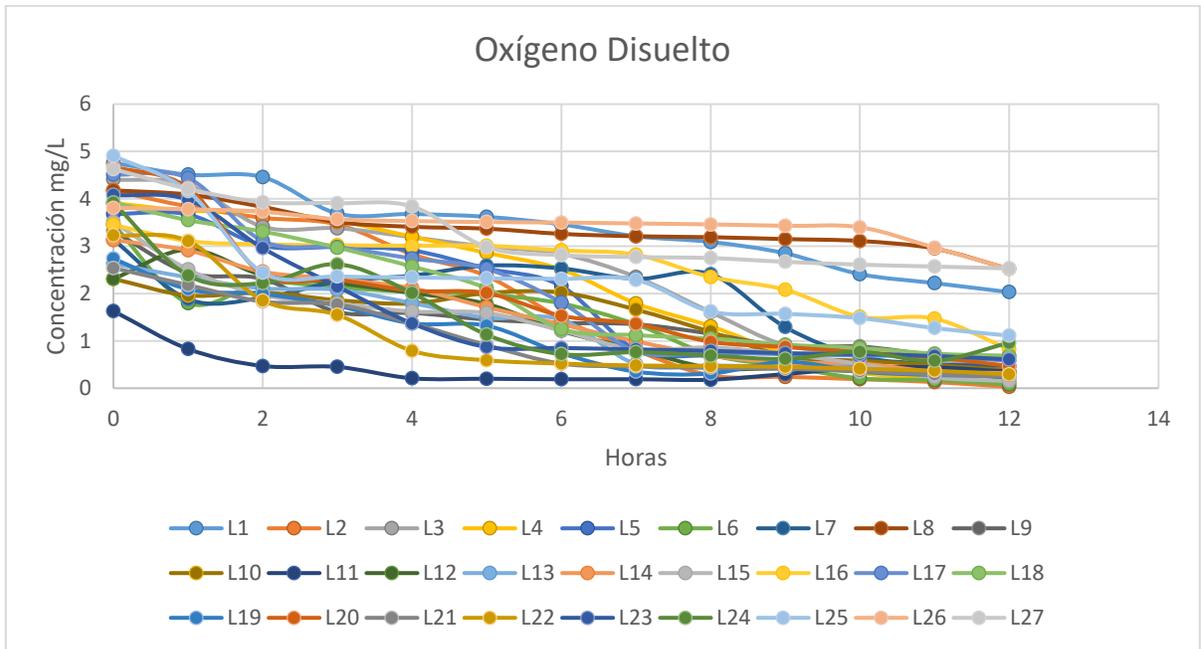
#### 6.4.1 Oxígeno Disuelto

Para este caso, donde usamos azúcar en lugar de melaza, el oxígeno disuelto se vio afectado por el nivel medio de melaza, que eran, así también el nivel medio de fosforo mostró un efecto similar al de la melaza, en el nivel medio. La fuente de nitrógeno al igual que la melaza y la fuente de fosforo, tuvieron en el nivel medio la mayor influencia el nivel de oxígeno disuelto; aunque la fuente de potasio mostró en su nivel alto una bajada de la concentración en el caldo. En cuanto el inóculo, se mantuvo cerca de la media en sus tres niveles. En el cuadro 41 se muestran todas las lecturas donde se puede apreciar que la lectura más baja fue de 0.01 mg/lit y la más alta fue de 4.41 mg/lit.

**Cuadro 41. Resultados del oxígeno disuelto del experimento 4.**

	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
L <sub>1</sub>	4.76	4.51	4.46	3.69	3.68	3.62	3.46	3.21	3.09	2.85	2.41	2.22	2.03
L <sub>2</sub>	4.17	3.84	3.60	3.46	2.83	2.37	1.47	0.8	0.27	0.24	0.19	0.13	0.03
L <sub>3</sub>	4.41	4.30	3.41	3.38	3.19	2.99	2.84	2.35	1.61	0.91	0.76	0.61	0.47
L <sub>4</sub>	3.91	3.75	3.73	3.54	3.2	2.86	2.51	1.79	1.31	0.73	0.33	0.21	0.13
L <sub>5</sub>	3.68	3.67	3.01	2.98	2.91	2.53	2.16	0.81	0.68	0.54	0.47	0.41	0.32
L <sub>6</sub>	3.46	1.80	2.22	2.13	2.03	1.98	1.79	1.35	0.71	0.46	0.21	0.17	0.08
L <sub>7</sub>	3.14	1.88	1.91	2.25	2.38	2.59	2.53	2.31	2.41	1.29	0.67	0.51	0.47
L <sub>8</sub>	4.18	4.09	3.83	3.51	3.41	3.37	3.26	3.21	3.19	3.15	3.11	2.95	2.52
L <sub>9</sub>	3.32	2.44	2.31	1.61	1.59	1.45	1.38	1.35	1.15	0.88	0.88	0.71	0.68
L <sub>10</sub>	2.31	1.96	2.02	1.86	1.79	2.01	2.02	1.66	1.19	0.68	0.58	0.49	0.38
L <sub>11</sub>	1.63	0.83	0.47	0.45	0.21	0.2	0.19	0.19	0.18	0.3	0.43	0.44	0.35
L <sub>12</sub>	2.31	2.93	2.39	2.22	2.01	1.78	1.21	0.82	0.43	0.42	0.36	0.34	0.21
L <sub>13</sub>	2.63	2.34	2.11	2.08	1.8	1.49	1.45	0.51	0.48	0.46	0.43	0.31	0.27
L <sub>14</sub>	3.13	2.91	2.46	2.31	2.11	1.71	1.35	0.99	0.69	0.54	0.52	0.35	0.32
L <sub>15</sub>	3.51	2.51	1.97	1.79	1.62	1.59	1.22	0.82	0.86	0.72	0.51	0.23	0.15
L <sub>16</sub>	3.45	3.11	3.04	3.02	3.01	3.01	2.91	2.82	2.35	2.08	1.51	1.47	0.82
L <sub>17</sub>	4.51	4.44	3.11	2.98	2.74	2.52	1.81	0.78	0.75	0.72	0.69	0.67	0.58
L <sub>18</sub>	3.92	3.55	3.31	2.97	2.57	2.11	1.25	1.12	1.05	0.92	0.85	0.73	0.68
L <sub>19</sub>	2.74	2.09	1.99	1.74	1.37	1.32	0.74	0.35	0.31	0.56	0.35	0.28	0.25
L <sub>20</sub>	4.68	4.23	2.41	2.29	2.06	2.01	1.53	1.36	0.98	0.87	0.76	0.65	0.47
L <sub>21</sub>	2.54	2.18	1.83	1.77	1.37	0.91	0.52	0.46	0.43	0.41	0.36	0.29	0.25
L <sub>22</sub>	3.23	3.11	1.85	1.55	0.79	0.59	0.52	0.48	0.47	0.45	0.41	0.37	0.29
L <sub>23</sub>	4.08	3.98	2.96	2.15	1.37	0.87	0.85	0.82	0.79	0.74	0.72	0.68	0.61
L <sub>24</sub>	3.92	2.38	2.22	2.62	2.01	1.13	0.72	0.76	0.69	0.62	0.77	0.58	0.96
L <sub>25</sub>	4.91	4.16	2.44	2.36	2.34	2.32	2.31	2.29	1.62	1.57	1.48	1.27	1.11
L <sub>26</sub>	3.81	3.78	3.73	3.57	3.53	3.51	3.5	3.48	3.46	3.43	3.4	2.97	2.52
L <sub>27</sub>	4.63	4.21	3.93	3.91	3.84	2.98	2.81	2.77	2.75	2.67	2.61	2.57	2.53

El comportamiento del oxígeno disuelto va en decremento en todos los experimentos, debido a que las bacterias van aumentando en número y consumen cada vez más oxígeno, por eso disminuye a través de las horas de fermentación como se muestra en la figura 33.



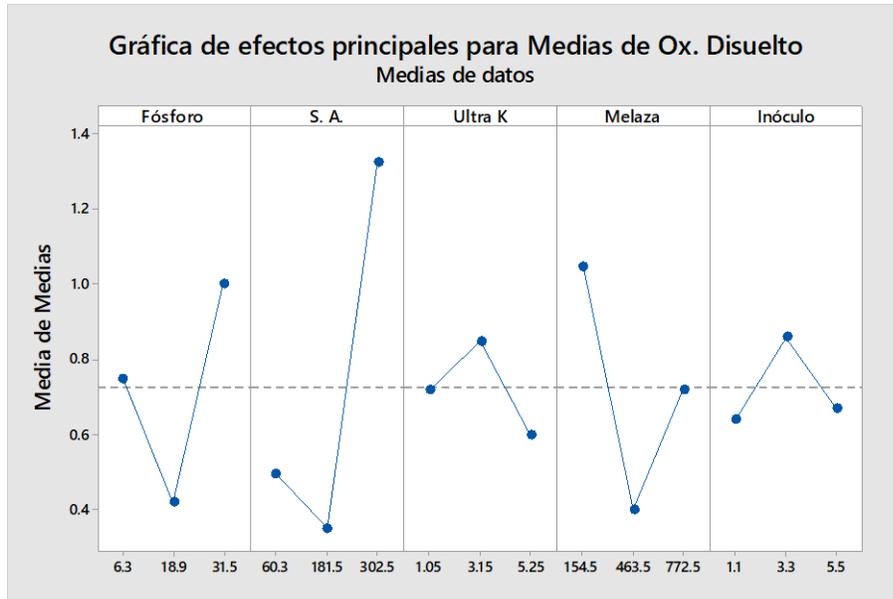
**Figura 33. Comportamiento del oxígeno disuelto del experimento 4.**

Se encontró que al igual que el azúcar, la concentración del oxígeno disuelto baja a mayor cantidad de melaza en el medio de cultivo, aunque se notó que, en el nivel medio, bajó más aún. El sulfato de amonio fue el que tuvo efecto en su nivel medio sobre el crecimiento bacteriano al tener el valor de significancia por debajo del  $\alpha=0.10$  los demás factores no tuvieron significancia (cuadro 42).

**Cuadro 42. ANOVA de medias del oxígeno disuelto del experimento 4.**

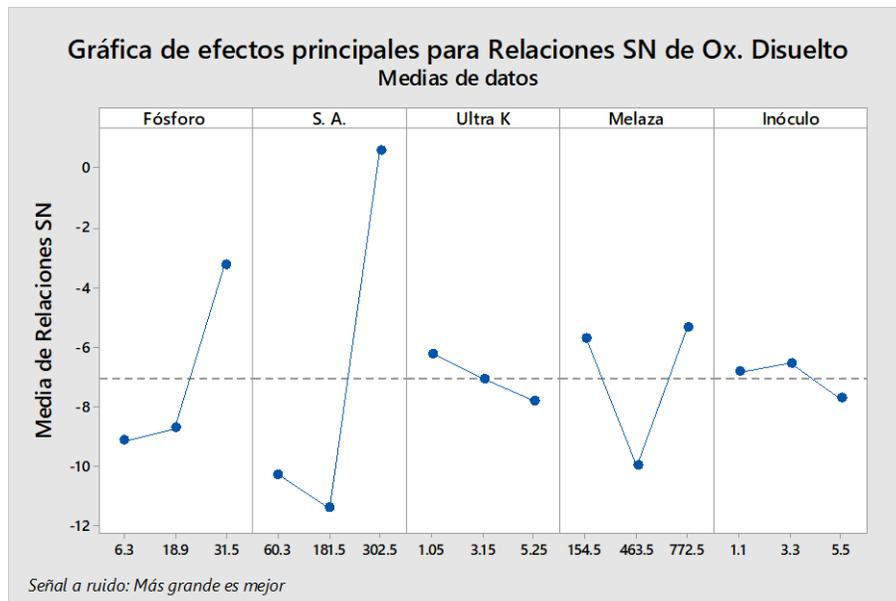
Fuente	GL	SC Sec.	SC Ajust.	MC Ajust.	F	p
Fosforo	2	1.5289	1.5289	0.7645	1.98	0.171
S.A.	2	4.9854	4.9854	2.4927	6.45	0.009
Ultra-K	2	0.2813	0.2813	0.1407	0.36	0.700
Melaza	2	1.9013	1.9013	0.9507	2.46	0.117
Inóculo	2	0.2545	0.2545	0.1273	0.33	0.724
Error Residual	16	6.1832	6.1832	0.3864		
Total	26	15.1347				

El fósforo en el nivel medio causó el nivel más bajo en la concentración del oxígeno disuelto en el medio, en contraste con el nivel alto que causó la mayor cantidad de oxígeno debido a la poca cantidad de bacterias contenidas en el caldo. El superfosfato de calcio triple en su nivel medio, el sulfato de amonio en su nivel alto, y la melaza en su nivel medio, fueron lo que bajaron más la concentración de oxígeno disuelto, como se observa en la figura 34.



**Figura 34. ANOVA de medias del oxígeno disuelto del experimento 4.**

Solo se muestra similitud en el caso del sulfato de amonio en su nivel alto, en la figura 35 se confirma que el nivel alto de sulfato de amonio es el que más afecta a l oxígeno disuelto, y la melaza en su nivel medio causan la caída de esta variable.



**Figura 35. ANOVA de relaciones de Señal/Ruido del oxígeno disuelto del experimento 4.**

En el caso de señal/ruido, el nivel alto de nitrógeno, además del nivel alto de fósforo, son los que menos afectan a la concentración de oxígeno disuelto en el medio. La melaza, el inóculo el potasio se mantuvieron cerca de la media, sin mostrar cambios extremos como se muestra en el cuadro 43.

**Cuadro 43. ANOVA de relaciones de señal/ruido del oxígeno disuelto del experimento 4.**

Fuente	GL	SC Sec.	SC Ajust.	MC Ajust.	F	<i>p</i>
Fósforo	2	196.6	196.63	98.313	1.55	0.247
SA	2	790.88	790.88	395.439	6.15	0.010
Ultra-K	2	11.21	11.21	5.607	0.09	0.917
Melaza	2	119.19	119.19	59.596	0.93	0.416
Inóculo	2	6.8	6.87	3.433	0.05	0.948
Error Residual	16	1029.32	1029.32	64.333		
Total	26	2154.10				

El factor que tuvo mayor significancia en el oxígeno disuelto en este experimento fue la fuente de nitrógeno que tiene un valor  $\alpha=0.010$ , por lo cual estamos seguros de que fue el que más influenció en esta variable.

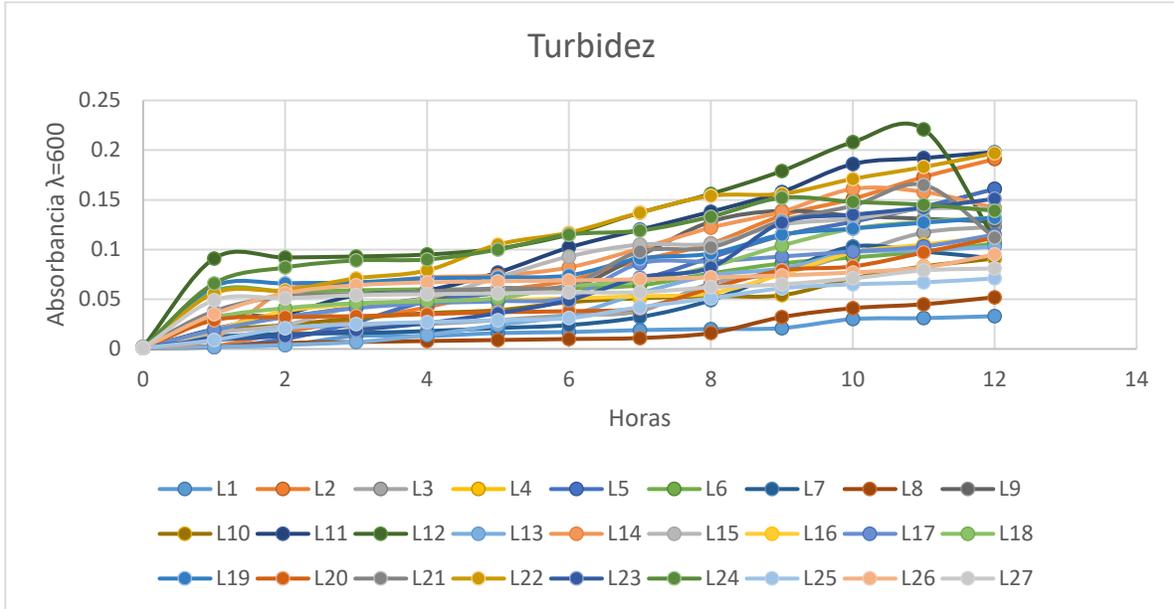
#### 6.4.2 Turbidez

En el caso de la turbidez, la corrida que tuvo mayor cantidad fue la L<sub>12</sub> (cuadro 44), la cual contenía, el nivel medio de melaza, el nivel bajo de nitrógeno, nivel medio de fósforo, nivel alto de potasio y el nivel alto en el inóculo. Alcanzó una turbidez de 0.221 a una densidad óptica de  $\lambda=600$ , a las 11 horas de fermentación.

**Cuadro 44. Resultados de la turbidez del experimento 4.**

	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
L <sub>1</sub>	0.001	0.003	0.004	0.013	0.013	0.016	0.017	0.019	0.02	0.021	0.03	0.031	0.033
L <sub>2</sub>	0.002	0.003	0.017	0.029	0.042	0.058	0.069	0.089	0.106	0.134	0.151	0.173	0.191
L <sub>3</sub>	0.002	0.017	0.022	0.023	0.025	0.029	0.034	0.038	0.066	0.076	0.096	0.117	0.123
L <sub>4</sub>	0.001	0.002	0.010	0.027	0.048	0.056	0.062	0.070	0.092	0.114	0.128	0.143	0.161
L <sub>5</sub>	0.001	0.002	0.010	0.027	0.048	0.056	0.062	0.070	0.092	0.114	0.128	0.143	0.161
L <sub>6</sub>	0.002	0.058	0.058	0.059	0.060	0.06	0.061	0.064	0.076	0.086	0.092	0.098	0.106
L <sub>7</sub>	0.001	0.012	0.015	0.016	0.018	0.021	0.024	0.032	0.049	0.077	0.103	0.098	0.091
L <sub>8</sub>	0.001	0.002	0.006	0.007	0.008	0.009	0.01	0.011	0.016	0.032	0.041	0.045	0.052
L <sub>9</sub>	0.002	0.032	0.033	0.042	0.051	0.061	0.061	0.094	0.128	0.139	0.134	0.131	0.128
L <sub>10</sub>	0.001	0.018	0.024	0.031	0.036	0.039	0.047	0.051	0.053	0.054	0.071	0.083	0.091
L <sub>11</sub>	0.001	0.02	0.035	0.054	0.059	0.077	0.102	0.120	0.138	0.158	0.186	0.192	0.198
L <sub>12</sub>	0.002	0.091	0.092	0.093	0.095	0.101	0.115	0.137	0.156	0.179	0.208	0.221	0.111
L <sub>13</sub>	0.001	0.002	0.004	0.007	0.014	0.024	0.034	0.056	0.074	0.081	0.097	0.099	0.103
L <sub>14</sub>	0.001	0.011	0.059	0.065	0.072	0.074	0.082	0.101	0.122	0.138	0.161	0.158	0.142
L <sub>15</sub>	0.001	0.016	0.024	0.043	0.051	0.072	0.093	0.105	0.106	0.125	0.131	0.141	0.141
L <sub>16</sub>	0.001	0.019	0.038	0.045	0.048	0.049	0.051	0.053	0.056	0.075	0.097	0.105	0.113
L <sub>17</sub>	0.001	0.019	0.032	0.041	0.046	0.048	0.052	0.086	0.088	0.093	0.098	0.103	0.115
L <sub>18</sub>	0.002	0.031	0.041	0.046	0.048	0.051	0.063	0.068	0.083	0.104	0.121	0.128	0.132
L <sub>19</sub>	0.001	0.063	0.066	0.067	0.071	0.072	0.074	0.091	0.096	0.115	0.121	0.127	0.132
L <sub>20</sub>	0.001	0.029	0.032	0.033	0.035	0.037	0.038	0.041	0.061	0.079	0.083	0.097	0.112
L <sub>21</sub>	0.002	0.038	0.053	0.055	0.058	0.061	0.064	0.098	0.102	0.129	0.144	0.165	0.112
L <sub>22</sub>	0.001	0.056	0.059	0.071	0.079	0.105	0.117	0.137	0.154	0.156	0.171	0.183	0.197
L <sub>23</sub>	0.002	0.009	0.013	0.019	0.026	0.036	0.049	0.072	0.082	0.127	0.135	0.142	0.151
L <sub>24</sub>	0.001	0.066	0.082	0.089	0.090	0.1	0.115	0.119	0.133	0.152	0.148	0.145	0.139
L <sub>25</sub>	0.001	0.009	0.021	0.025	0.027	0.029	0.031	0.042	0.051	0.061	0.065	0.067	0.071
L <sub>26</sub>	0.001	0.035	0.056	0.064	0.067	0.068	0.069	0.070	0.072	0.074	0.077	0.082	0.095
L <sub>27</sub>	0.001	0.049	0.051	0.054	0.055	0.056	0.057	0.057	0.062	0.065	0.071	0.079	0.081

La tendencia sigue en cuanto a la turbidez, aumenta al paso de las horas de fermentación, aunque existen aumentos en función a la composición de cada medio de cultivo o corrida, en este caso el medio de cultivo con el que se alcanzó la mayor cantidad de bacterias fue el que tenía el nivel medio de melaza, nivel bajo de sulfato de amonio, nivel medio de fósforo, nivel alto de potasio y nivel alto del inóculo como se muestra en la figura 36.



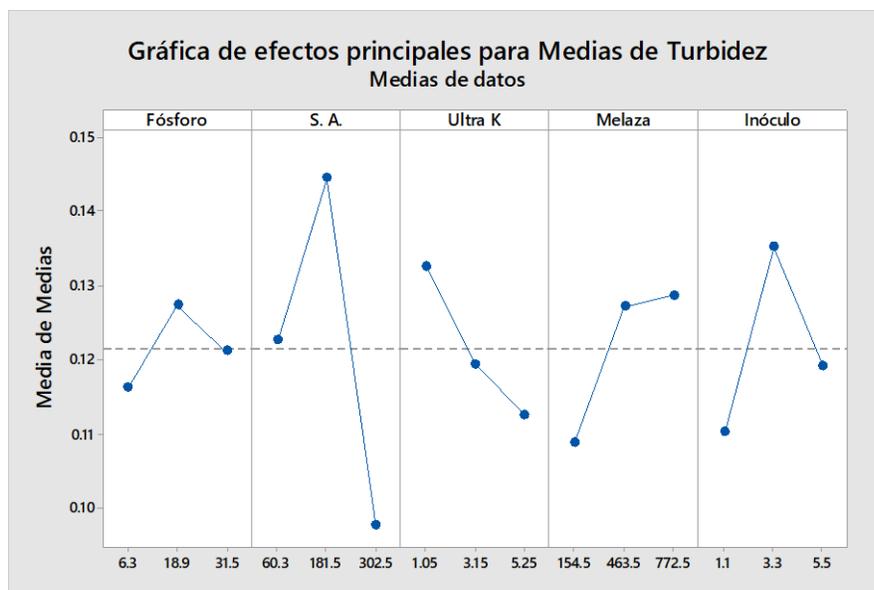
**Figura 36. Comportamiento de la turbidez del experimento 4.**

El ANOVA de medias (cuadro 45) muestra que el sulfato de amonio tuvo significancia en el oxígeno, al tener su valor  $p$  por debajo de  $\alpha=0.10$ , según el análisis, solo en sulfato de amonio tuvo significancia.

**Cuadro 45. ANOVA de medias de la turbidez del experimento 4.**

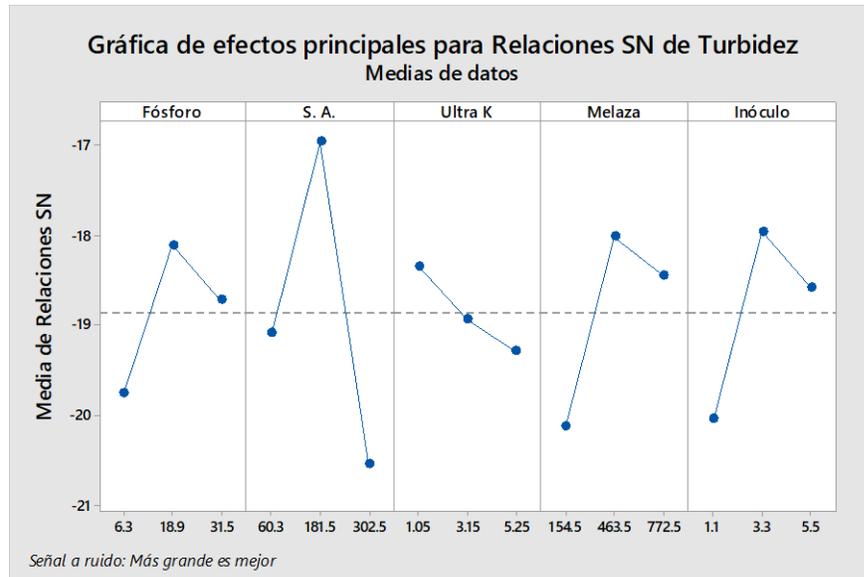
Fuente	GL	SC Sec.	SC Ajust.	MC Ajust.	F	p
Fósforo	2	0.000558	0.000558	0.000279	0.18	0.836
S.A.	2	0.009954	0.009954	0.004977	3.22	0.067
Ultra-K	2	0.001880	0.001880	0.000940	0.61	0.556
Melaza	2	0.002177	0.002177	0.001088	0.61	0.509
Inóculo	2	0.002886	0.002886	0.001443	0.93	0.413
Error Residual	16	0.024693	0.024693	0.001543		
Total	26	0.042149				

El nivel medio de sulfato de amonio en combinación con el nivel medio de superfosfato de calcio simple, el nivel bajo de Utra-K y el nivel medio de Serenade, fueron los que más aumentaron la turbidez, como se muestra en la figura 37.



**Figura 37. ANOVA de medias de la turbidez del experimento 4.**

En este experimento, a diferencia de todos los demás, la melaza cambio la tendencia que venía de los demás experimentos, causó una mayor necesidad de nitrógeno, aunque bajó también bajo la necesidad de fuente de carbono, teniendo el nivel de suficiencia con el nivel medio de melaza, como se muestra en la figura 38.



**Figura 38. ANOVA de relaciones de señal/ruido de la turbidez del experimento 4.**

En el ANOVA de relación de señal/ruido (cuadro 46) muestra que, aunque en el ANOVA de medias, el sulfato de amonio se pasa el nivel de  $\alpha$  por poco. Pero la tendencia del aumento de la turbidez es notoria.<sup>7</sup>

**Cuadro 46. ANOVA de relaciones de señal/ruido de la turbidez del experimento 4.**

Fuente	GL	SC Sec.	SC Ajust.	MC Ajust.	F	P
--------	----	---------	-----------	-----------	---	---

Fosforo	2	12.393	12.393	6.196	0.53	0.596
SA	2	58.698	58.698	29.349	2.53	0.111
Ultra-K	2	4.083	4.083	2.041	0.18	0.840
Melaza	2	22.472	22.472	11.236	0.97	0.400
Inóculo	2	20.872	20.872	10.436	0.90	0.426
Error Residual	16	185.407	185.407	11.588		
Total	26	303.925				

La fuente de nitrógeno tiene el valor que más se acercó al valor de  $\alpha=10$ , debido a esto, fue el que más afectó al crecimiento bacteriano.

Como recomendación, tenemos que, el nivel medio del superfosfato de calcio triple no tuvo significancia en la turbidez, por lo tanto, se recomienda agregar 6.3 gr/50lt en el medio de cultivo. Para el caso del sulfato de amonio que, si tuvo significancia en el crecimiento bacteriano, el nivel medio fue el que mayor afecto tuvo, por lo tanto, agregar 181.5 gr/50lt. Para el caso del Ultra-K el nivel bajo fue el que más afectó positivamente el crecimiento bacteriano, por esto, agregar 1.05 gr/50lt, el nivel necesario de melaza fue el medio, agregar 463.5 gr/50lt y el inóculo, el nivel necesario se recomienda el medio, lo que significa, agregar 3.3 gr/50lt. La fórmula completa se muestra en el cuadro 47.

**Cuadro 47. Recomendación de la fórmula del experimento 4.**

Melaza	463.5 gr
Super Fosfato de Calcio Triple	6.3 gr
Sulfato de Amonio	181.5 gr

Ultra-K	1.05 gr
Serenade	3.3 gr

#### 6.4.3 pH

Una vez más, el pH se mantuvo cerca de la media, sin cambios significativos, la corrida que tuvo el pH más bajo fue la L<sub>22</sub> (cuadro 48), la cual tenía el nivel medio de nitrógeno, el nivel alto de melaza, el nivel bajo de fosforo, el nivel alto de potasio y el nivel bajo del inóculo.

**Cuadro 48. Resultados del pH para el experimento 4.**

	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
L <sub>1</sub>	7.32	7.31	7.3	7.29	7.29	7.28	7.27	7.26	7.25	7.24	7.23	7.22	7.21
L <sub>2</sub>	7.58	7.57	7.56	7.55	7.54	7.53	7.52	7.49	7.47	7.46	7.45	7.44	7.43
L <sub>3</sub>	7.49	7.48	7.45	7.44	7.43	7.38	7.31	7.26	7.25	7.24	7.23	7.22	7.21
L <sub>4</sub>	7.58	7.57	7.56	7.44	7.41	7.38	7.31	7.26	7.25	7.24	7.23	7.22	7.21
L <sub>5</sub>	7.61	7.58	7.57	7.56	7.41	7.31	7.29	7.26	7.25	7.24	7.23	7.22	7.21
L <sub>6</sub>	7.67	7.58	7.57	7.56	7.41	7.31	7.22	7.21	7.19	7.18	7.17	7.15	7.12
L <sub>7</sub>	7.67	7.65	7.64	7.61	7.58	7.56	7.53	7.41	7.38	7.35	7.35	7.32	7.31
L <sub>8</sub>	7.67	7.65	7.64	7.63	7.61	7.59	7.58	7.57	7.55	7.52	7.49	7.49	7.45
L <sub>9</sub>	7.67	7.65	7.64	7.63	7.59	7.58	7.56	7.56	7.55	7.51	7.48	7.45	7.43
L <sub>10</sub>	7.46	7.45	7.38	7.35	7.31	7.29	7.22	7.16	7.04	7.01	6.92	6.81	6.75
L <sub>11</sub>	7.41	7.39	7.35	7.31	7.29	7.12	7.04	7.03	7.01	6.98	6.97	6.95	6.95
L <sub>12</sub>	7.41	7.41	7.41	7.4	7.38	7.23	7.13	7.11	7.03	6.91	6.67	6.41	6.39
L <sub>13</sub>	7.49	7.47	7.45	7.41	7.39	7.31	7.27	7.04	7.01	6.92	6.87	6.85	6.81
L <sub>14</sub>	7.49	7.49	7.49	7.49	7.45	7.33	7.22	7.21	7.18	7.15	7.11	7.08	7.01
L <sub>15</sub>	7.49	7.49	7.48	7.47	7.45	7.45	7.43	7.42	7.41	7.4	7.38	7.35	7.28
L <sub>16</sub>	7.62	7.61	7.59	7.58	7.56	7.51	7.49	7.47	7.43	7.41	7.38	7.35	7.31
L <sub>17</sub>	7.78	7.76	7.74	7.71	7.68	7.67	7.62	7.61	7.58	7.55	7.49	7.46	7.43
L <sub>18</sub>	7.81	7.51	7.57	7.58	7.53	7.51	7.49	7.47	7.41	7.31	7.25	7.04	7.01
L <sub>19</sub>	7.31	7.29	7.27	7.27	7.26	7.25	7.24	7.23	7.23	7.21	7.21	7.19	7.05
L <sub>20</sub>	7.61	7.61	7.59	7.58	7.58	7.56	7.55	7.54	7.51	7.49	7.47	7.45	7.44
L <sub>21</sub>	7.61	7.61	7.58	7.56	7.51	7.49	7.47	7.45	7.41	7.35	7.13	7.09	6.95
L <sub>22</sub>	7.42	7.38	7.32	7.31	7.29	7.13	7.04	7.01	6.71	6.68	6.59	6.55	6.48
L <sub>23</sub>	7.4	7.39	7.33	7.31	7.26	7.19	7.13	7.09	6.91	6.86	6.85	6.71	6.65
L <sub>24</sub>	7.13	7.13	7.13	7.13	7.13	7.13	7.11	7.1	7.09	7.08	7.02	6.69	6.95
L <sub>25</sub>	7.68	7.67	7.61	7.58	7.57	7.55	7.42	7.41	7.37	7.35	7.22	7.21	7.11
L <sub>26</sub>	7.71	7.69	7.68	7.67	7.67	7.66	7.61	7.58	7.56	7.53	7.51	6.97	6.95
L <sub>27</sub>	7.31	7.3	7.29	7.29	7.28	7.26	7.24	7.31	7.22	7.21	7.19	7.16	7.12

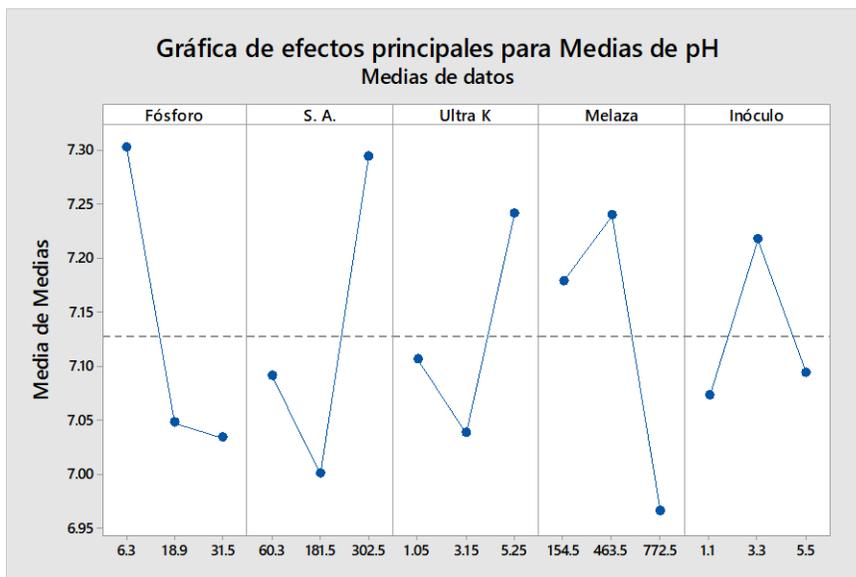
Al no mostrar grandes cambios se sacaron las medias de las mediciones del pH de cada corrida, y al final la media de todo el experimento, el cual fue de 7.3 (cuadro 49). No se dieron cambios significativos en el pH.

**Cuadro 49. Medias del pH del experimento 4.**

L <sub>1</sub>	7.26
L <sub>2</sub>	7.5
L <sub>3</sub>	7.33
L <sub>4</sub>	7.35
L <sub>5</sub>	7.36
L <sub>6</sub>	7.33
L <sub>7</sub>	7.48
L <sub>8</sub>	7.57
L <sub>9</sub>	7.56
L <sub>10</sub>	7.16
L <sub>11</sub>	7.13
L <sub>12</sub>	7.06
L <sub>13</sub>	7.17
L <sub>14</sub>	7.28
L <sub>15</sub>	7.42
L <sub>16</sub>	7.48
L <sub>17</sub>	7.62
L <sub>18</sub>	7.42
L <sub>19</sub>	7.23
L <sub>20</sub>	7.53
L <sub>21</sub>	7.4
L <sub>22</sub>	6.99
L <sub>23</sub>	7.08
L <sub>24</sub>	7.06
L <sub>25</sub>	7.44
L <sub>26</sub>	7.52
L <sub>27</sub>	7.24
	7.332222

El fósforo fue bajando el pH conforme se fue aumentando la cantidad en el medio, la mayor caída del pH se dio del nivel bajo al nivel medio, ya que bajo de 7.3 a 7, y del nivel medio al nivel alto no fue tan brusco el cambio. En el caso del nitrógeno, la cantidad más alta, subió el pH, siendo el nivel medio el que más lo bajó; algo parecido sucedió con el potasio que, en su nivel más alto, subió el pH siendo que, en los niveles bajo y medio, representaron una leve bajada en este variable. La melaza, en sus niveles bajo y medio se mantuvieron muy cerca de la media sin tener un cambio significativo, cosa contraria con el nivel alto, ya que

significo una bajada. El inóculo se mantuvo cerca de la media, promediando así, en todas las corridas un pH de 7.3. Como se muestra en la figura 39.



**Figura 39. ANOVA de medias del pH del experimento 4.**

### 6.4.3 Temperatura

Como el pH, la temperatura no tuvo gran cambio en el transcurso de cada corrida, siempre se mantuvo de 16°C a 20°C. En todos los experimentos no se dieron cambios bruscos de temperatura, y este no es la excepción, en el cuadro 50 se muestran todas las lecturas.

**Cuadro 50. Resultados de temperatura del experimento 4.**

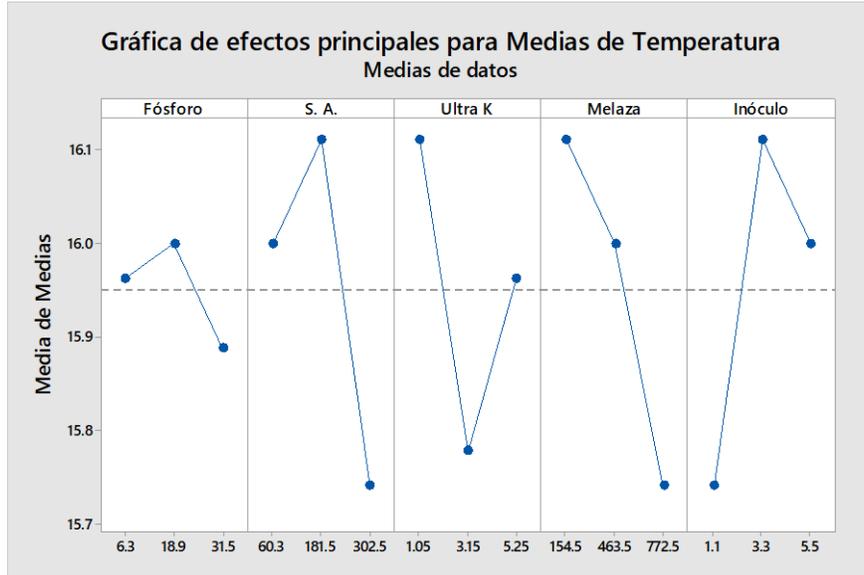
	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
L <sub>1</sub>	17	17	16	16	16	16	16	16	16	16	16	16	16
L <sub>2</sub>	18	17	17	17	17	17	17	17	17	17	17	17	17
L <sub>3</sub>	18	18	17	17	17	17	16	16	16	16	16	16	16
L <sub>4</sub>	18	17	17	17	17	17	16	16	16	16	16	16	16
L <sub>5</sub>	18	17	17	17	17	17	16	16	16	16	16	16	16
L <sub>6</sub>	18	18	17	17	17	17	16	16	16	16	16	16	16
L <sub>7</sub>	18	17	17	16	15	15	15	15	15	15	15	16	16
L <sub>8</sub>	17	16	16	16	16	16	16	16	16	16	16	16	16
L <sub>9</sub>	18	17	17	17	17	16	16	16	15	15	15	15	15
L <sub>10</sub>	19	17	17	17	17	16	16	16	15	15	15	15	15
L <sub>11</sub>	18	17	17	17	17	17	16	16	16	16	16	16	16
L <sub>12</sub>	18	17	17	17	16	16	16	16	16	16	16	16	16
L <sub>13</sub>	18	18	17	17	17	17	16	16	16	16	16	16	16
L <sub>14</sub>	19	18	18	17	17	17	16	16	16	16	16	16	16
L <sub>15</sub>	18	18	17	17	17	17	17	17	17	17	17	17	17
L <sub>16</sub>	19	18	17	17	17	16	16	16	16	16	16	16	16
L <sub>17</sub>	19	18	17	17	17	16	16	16	16	16	16	16	16
L <sub>18</sub>	18	17	17	17	16	16	16	16	16	16	16	16	16
L <sub>19</sub>	19	18	18	17	17	17	17	16	16	16	16	16	16
L <sub>20</sub>	18	18	17	17	17	17	17	16	16	16	16	16	16
L <sub>21</sub>	19	18	18	17	17	17	17	16	16	16	16	16	16
L <sub>22</sub>	19	18	17	17	16	16	16	16	16	16	16	16	16
L <sub>23</sub>	18	17	17	16	16	16	16	16	16	16	16	16	16
L <sub>24</sub>	18	17	17	17	17	16	16	16	16	16	16	16	16
L <sub>25</sub>	18	18	17	17	16	16	16	16	16	15	15	15	15
L <sub>26</sub>	18	18	18	17	17	17	16	16	16	16	16	16	16
L <sub>27</sub>	18	18	18	17	17	17	16	16	16	16	16	16	16

La temperatura no tuvo mayor cambio, al ser todos los datos cercanos a la media, no resultó significativo. Las medias de temperatura de cada corrida se muestran en el cuadro 51. Aunque el experimento se llevó a cabo en noviembre, no afectó esta vez a la temperatura del medio de cultivo

**Cuadro 51. Medias de la temperatura del experimento 4.**

L <sub>1</sub>	16.15
L <sub>2</sub>	17.07
L <sub>3</sub>	16.61
L <sub>4</sub>	16.53
L <sub>5</sub>	16.53
L <sub>6</sub>	16.61
L <sub>7</sub>	15.76
L <sub>8</sub>	16.07
L <sub>9</sub>	16.07
L <sub>10</sub>	16.15
L <sub>11</sub>	16.53
L <sub>12</sub>	16.38
L <sub>13</sub>	16.61
L <sub>14</sub>	16.76
L <sub>15</sub>	17.15
L <sub>16</sub>	16.61
L <sub>17</sub>	16.61
L <sub>18</sub>	16.38
L <sub>19</sub>	16.84
L <sub>20</sub>	16.69
L <sub>21</sub>	16.84
L <sub>22</sub>	16.53
L <sub>23</sub>	16.3
L <sub>24</sub>	16.46
L <sub>25</sub>	16.15
L <sub>26</sub>	16.69
L <sub>27</sub>	16.69

La media de temperatura de este experimento fue de 16.5 °C, esto se debió a que el experimento fue realizado en época de fríos, en diciembre, por eso se vio afectado por la temperatura ambiente. La temperatura no mostró alguna limitación en el crecimiento bacteriano, todas las variables se mantuvieron cerca de las medias (figura 40).



**Figura 40. ANOVA de medias de la temperatura del experimento 4.**

#### 6.4 Discusión

Al estar representando las condiciones que se tienen en campo para realizar estos biorreactores, no se pueden manipular la temperatura ya que en el experimento 3 bajaron las temperaturas ambientales y por la tanto el crecimiento bacteriano se vio un poco afectado, pero no en gran medida.

El diseño y el armado del biorreactor de bajo costo, lo que representa una gran ventaja para los agricultores al presentar una inversión mínima para el proyecto de la producción de *Bacillus subtilis* para el control de enfermedades de los cultivos, para el mejoramiento de suelos y como fuente de reguladores de crecimiento de las plantas.

En comparación con el trabajo de Sreekumar y Krishnan [23], quienes lograron un crecimiento bacteriano de  $10.052 \times 10^9$  a las 24 horas de fermentación con ingredientes que incluían extracto de carne, citrato de amonio como fuentes de nitrógeno, además de lactosa, peptona y glucosa como fuente de energía e hidrógeno-fosfato de potasio como fuente de fósforo y potasio, que a su vez algunos de estos ingredientes son difíciles de conseguir para personas que no tienen acceso a un laboratorio. El medio de cultivo previamente desarrollado en el ITEL resultó ser más barato y fácil de conseguir, además de obtener a las 11 horas de fermentación una concentración de  $1 \times 10^{11}$  UFC/ml.

No existen muchos trabajos como este ya que la mayoría se dedican a la producción y extracción de metabolitos secundarios como Plaza [41] que uso residuos de la agroindustria para producir un biosurfactante, o a la biorremediación de residuos agroindustriales como Miranda [39] que usó *Bacillus subtilis*, para aprovechar dichos residuos.

En el caso del pH y la temperatura de todos y cada uno de los experimentos, estos parámetros no se vieron afectados por ninguno de los factores en sus diferentes niveles; por esto solo se calcularon las medias de cada resultado.

La melaza mostró que, a menor concentración, suministra el nivel necesario de carbono para el crecimiento bacteriano, aunque, se necesite más nitrógeno y potasio.

## VII. CONCLUSIONES

El uso de fertilizantes químicos de uso diario resulta muy viable para la preparación de caldo de cultivo para producir la mayor cantidad de *Bacillus subtilis*, además de la fuente de energía que es el azúcar, se puede sustituir por melaza y bajar incluso, más aún el costo de producción de esta bacteria.

Es muy importante la reducción y en un futuro no muy lejano la erradicación del uso de productos de síntesis química para el control de enfermedades de los cultivos; además de esto, que los productores tengan acceso a la información de la producción de bio-fungicidas, para el manejo de esta problemática que es la que más limita la remuneración de los productores, ya que, del gasto total para producción de cultivos, se gasta en manejo fitosanitario.

La recomendación para la producción masiva de 50 litros de *Bacillus subtilis* a un costo bajo, usando ingredientes fáciles de conseguir, además también de un inóculo adecuado es:

Melaza	463.5 gr
Super Fosfato de Calcio Triple	6.3 gr
Sulfato de Amonio	181.5 gr
Ultra-K	1.05 gr
Serenade	3.3 gr

## VII. LITERATURA CITADA

1. Serrat-Díaz, C.M. y A.A. Méndez, (1992) Construcción y Validación Experimental de un Biorreactor Artesanal Tipo Tanque Agitado para Fermentaciones Sumergidas a Escala de Laboratorio. *Tecnología Química, Revista Scielo*. 35:362-375. Santiago de Cuba. Cuba.
2. McGovern P. E., S. J. Fleming & S. H. Katz (1996). *The Origins and Ancient History of Wine, Food and Nutrition in History and Antropology*. 1st Edition, Routledge, London. 18 p.
3. Kennedy J.A., C. Saucier & Y. Glories (2006). *Grape and Wine Phenolics: History and Perspective*. *American Journal of Enology and Viticulture*. 1<sup>st</sup> Edition 239:239-248.
4. Alba-Lois L. & C. Segal-Kischinevzky (2010) *Beer & Wine Makers*. *Nature Education*. 3:9-17.
5. James A., J.A. Kennedy, C. Saucier & Y. Glories (2006). *Grape and Wine Phenolics: History and Perspective*. *American Journal of Enology and Viticulture*. 57:239-248.
6. Walker G. & G. Stewart. (2016). *Saccharomyces cerevisiae* in the Production of Fermented Beverages. *Beverages*. 2:4-30.
7. Quinn R. (2013). Rethinking Antibiotic, World War II and the Penicillin Collaborative. *American Journal of Public Health* 103. No. 3. USA 427:425-436.
8. Bentley R. & J.W. Benett. (2008). *A Ferment of Fermentations: Reflections on the Production of Commodity Chemicals Using Microorganisms*. ELSEVIER. 63:1-32.
9. Loera Burnes, P.I. (2003) *Simulación Estocástica y Control Optimo de Procesos para el Tratamiento de Aguas Residuales de Excretas Porcinas*. Universidad de Sonora. Tesis de Maestría.

10. Kadic E. & T. J. Heindel. (2014) An Introduction to Bioreactor Hydrodynamics and Gas-Liquid Mass Transfer. Department of Mechanical Engineering. Iowa State University: United States. Iowa. 4 p.
11. Owerhand A.C., K. Tiihonen, H. Mäkeläinen & N. Rautonen (2009). Non-starch polysaccharides in the gastrointestinal tract. McClements y Decker. Designing Funcional Foods. 1st Edition. Woodhead Publishing. Cambridge UK. 127:128-147.
12. Galarce-Castro, D. I. (2017). Concepción, diseño, implementación y operación de un biorreactor continuo para caracterización de parámetros dinámicos de sistemas elicitor-promotor-efector en biología sintética. Universidad de Chile. Tesis de Ingeniería.
13. Corrales-Ramírez L.C. y L. Caycedo (2016). *Bacillus spp*: Una alternativa para la promoción vegetal por dos caminos enzimáticos. Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca. Nova, 15:45-67.
14. Moreno Reséndes A., V. García, J. L. Reyes, J. Vázquez y P. Cano (2018). Rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal: una alternativa de biofertilización para la agricultura sustentable. Revista Colombiana de Biotecnología. 20:69-83.
15. Lifeder (2019). *Bacillus subtilis*: Características, Morfología y Enfermedades. <https://www.lifeder.com/bacillus-subtilis/>. (junio 2020).
16. Caicedo M.S.E., y M.J.A. Chacón. (2017) Pruebas bajo invernadero de cepas de *Bacillus Subtilis* como agente de biocontrol de *Alternaria spp.* en *Brassica Oleracea* variedad *itálica* y técnicas de conservación de cepas. Universidad Politécnica Salesiana. Tesis de Ingeniería.
17. Bettiol W., C. M. Rivera, P. Mondino, C. Colmenares Y A.J.R. Montealegre (2014). Control Biológico de Enfermedades de Plantas en América Latina y el Caribe. Capítulo 5. Control biológico de enfermedades de plantas en Chile. Departamento de Sanidad Vegetal. Facultad de Ciencias Agronómicas. Universidad de Chile.

18. Caicedo M.S.E. y M.J.A Chacón. (2017) Pruebas bajo invernadero de cepas de *Bacillus Subtilis* como agente de biocontrol de *Alternaria spp.* En *Brassica Oleracea* variedad *itálica* y técnicas de conservación de cepas. Universidad Politécnica Salesiana. Tesis de Ingeniería.
19. Errington J. (2003) Regulation of Endospore Formation in *Bacillus Subtilis*. *Nature Reviews Microbiology*, 1:117-126.
20. Realpe M. E., C. A. Hernández y C. I. Agudelo. (2002) Especies del género *Bacillus*: morfología macroscópica y microscópica. *Biomédica*, 22:106-109.
21. Lawford H. & J. Rousseau. (1996). Studies on Nutrient Requirements and Cost-Effective Supplements for Ethanol Production by Recombinant *E. coli*. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 57:307-326.
22. Ghasemi S. & M. Ahmadzadeh. (2013). Optimisation of a cost-effective culture medium for the large-scale production of *Bacillus subtilis* UTB96. *Archives of Phytopatology and Plant Protection*, 46:1-12.
23. Sreekumar G & K. Soundarajan. (2010). Enhanced biomass production study on probiotic *Bacillus subtilis* SK09 by medium optimization using response surface methodology. *African Journal Biotechnolology*, 9:8078–8084.
24. Zhong J., Z. Xiaoyong, R. Yanli, Yang J., T. Hong, & Z. Jinyan. (2014). Optimization of *Bacillus subtilis* cell growth effecting jjean-peptide production in fed batch fermentation using central composite design. *Electronic Journal of Biotechnology*, 17:132-136.
25. Posada L, M. Romero & V. Villegas (2015). Effect of medium components and culture conditions in *Bacillus subtilis* EA-CB0575 spore production. Grupo de Investigación en Ciencias Biológicas y Bioprocesos (CIBIOP), Department of Process Engineering, 38:1-10
26. Cooper D., C Macdonald., S Duff., & N. Kosaric. (1981) Enhanced production of surfactin from *Bacillus subtilis* by continuous product removal and metal cation additions. *Appl. Environ. Microb.*,42:408–412

27. Willenbacher, J., W.Yeremchuk, T.Mohr, C.Syldatk, & R. Hausmann. (2015). Enhancement of Surfactin yield by improving the medium composition and fermentation process. *AMB Express*, 5:1-145.
28. Peighamya-Ashnaei, S., A.Sharifi-Tehrani, M.Ahmadzadeh , & K. Behboudi. (2008). Interaction of media on production and biocontrol efficacy of *Pseudomonas fluorescens* and *Bacillus subtilis* against grey mould of apple. *Communications in agricultural and applied biological sciences*, 91:249–255.
29. Yáñez-Mendizábal, V., I.Viñas, J.Usall, R.Torres, C. Solsona y N. Teixidó. (2012). Producción del agente de control biológico postcosecha *Bacillus subtilis* CPA-8 utilizando productos y subproductos comerciales de bajo costo. *Control biológico*, 60:280-289.
30. Carvalho A., U. Lacerda-de-Oliveira, F. H., M. Portella-de-Corrêa, R. De Lima-Ramos, E. Ribeiro-Gouveia, & A. M. Souto-Maior. (2010). Growth, sporulation and production of bioactive compounds by *Bacillus subtilis* R14. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 53:643-652.
31. T. Yanjun, F. Yixiao, L. Jianjun, Z. Xiangying, & C. Wei. (2016). Effect of nitrogen, carbon sources and agitation speed on acetoin production of *Bacillus subtilis* SF4-3. *Electronic Journal of Biotechnology*, 19:41-49.
32. Gallardo E. R. (2015) Estandarización de la producción de biopesticidas a base de *Bacillus subtilis* para el control de la moniliasis. Facultad de ingeniería y ciencias agropecuarias. Universidad de las Américas. Ecuador. Tesis de Ingeniería
33. Cobo C. F. (2017). Evaluación de medios de cultivo líquidos para multiplicación de la bacteria *Bacillus subtilis*. Colegio de Ciencias e Ingeniería. Universidad De San Francisco De Quito. Quito, Ecuador. Tesis de Ingeniería.
34. Ojeda G. V. (2007). Formulación de un Biocontrolador de *Erwinia Carotovora* en Polvo, a Partir de una Cepa de *Bacillus Subtilis* Utilizando

Secado Spray. Escuela de Ingeniería De Alimentos. Universidad Austral De Chile. Tesis de licenciatura

35. BOŽIĆ N., Ruiz J., López J. & VUJČIĆ Z. (2010). Optimization of the growth and  $\alpha$ -amylase production of *Bacillus subtilis* IP 5832 in shake flask and laboratory fermenter batch cultures. Journal of the Serbian Chemical Society, 76:965-972.
36. Muis, A. (2016). Biomass production and formulation of *Bacillus subtilis* for biological control. Indonesian Journal of Agricultural Science, 7:51-56.
37. Nhu N., N. Van Cach, & T. Dihn. (2017). Optimization of fermentation conditions for collecting of *Bacillus subtilis* NT1 for biomass used in *Canna edulis*. ker processing wastewater treatment. Journal of Forestry Science and Technology, 7:3-8.
38. Ling H. (2016). Batch submerged fermentation in shake flask culture and bioreactor: influence of different agricultural residuals as the substrate on the optimization of xylanase production by *Bacillus subtilis* and *Aspergillus brasiliensis*. Journal of Applied Biotechnology & Bioengineering, 1:1-9.
39. Miranda S., L. Porras & A. Schmidt (2020). Evaluation of agro-industrial residues produced in Costa Rica for a low-cost culture medium using *Bacillus subtilis* 168. Tecnología en Marcha, 33:15-25.
40. Cho J., Y. Kim & Y. Kim (2009). Optimization of culture media for *Bacillus* species by statistical experimental design. Korean Journal of Chemistry Engineering, 26:754-759.
41. Płaza, G. A., M.Pacwa-Płociniczak, , Z. Piotrowska-Seget, , K. Jangid, & K. A. Wilk. (2011). Agroindustrial wastes as unconventional substrates for growing of *bacillus* strains and production of biosurfactant. Environment Protection Engineering, 37:63–71.
42. Porcel E. (2017). Producción de bacterias promotoras del crecimiento de plantas (PGPBs) a partir de residuos de la industria agroalimentaria.

Faculta de ciencias experimentales, Universidad de Almería. Tesis de Maestría.

43. Layton C., E. Maldonado, L. Monroy, L.C. Corrales & L.C. Sánchez (2011) *Bacillus spp.*; perspectiva de su efecto biocontrolador mediante antibiosis en cultivos afectados por fitopatógenos, 9:177-187.