



**UNIVERSIDAD POLITÉCNICA DE NICARAGUA**



**ESCUELA DE INGENIERÍA**

**TRABAJO MONOGRÁFICO PARA OPTAR AL TÍTULO DE “INGENIERO EN  
BIOTECNOLOGIA INDUSTRIAL”**

**TÍTULO: “Escalado del Proceso de Producción de un Biofertilizante a Base de  
un Consorcio Bacteriano”**

**Autor: Br. Kevin Alexander Rivera Alonso**

**Br. Jasser Alexander Villegas Ruiz**

**Br. Lenin Ariel Moreno Aragão**

**Tutor: Ph.D. Leandro Páramo Aguilera**

**Managua, Nicaragua.**

**Julio, 2021**

## ***Dedicatoria***

*A Dios por ser dador de sabiduría, a todos aquellos investigadores e investigadoras que día a día trabajan por el futuro de la ciencia. A nuestras familias, compañeros y docentes que son parte de nuestra formación profesional como Ingenieros en Biotecnología Industrial.*

***Kevin Alexander Rivera Alonso***

***Jasser Alexander Villegas Ruiz***

***Lenin Ariel Moreno Aragón.***

## ***Agradecimientos***

*Agradecemos al esfuerzo de nuestras familias por el apoyo económico, espiritual y motivacional que nos han brindado, de igual forma a todos aquellos que creyeron en nosotros y apoyaron hasta el final.*

*Al Doctor Leandro Alberto Páramo Aguilera por ser nuestro tutor y guía, a la decana Sonia Guillen por su apoyo incondicional, al Programa de Investigación Estudios Nacionales y Servicios Ambientales (PIENSA) por poner a nuestra disposición sus instalaciones y a la Universidad Politécnica de Nicaragua (UPOLI) por brindarnos su confianza y el financiamiento de la presente investigación, Gracias a todos.*

***Kevin Alexander Rivera Alonso***

***Jasser Alexander Villegas Ruiz***

***Lenin Ariel Moreno Aragón.***

## Resumen

Se desarrolló a escala de banco un biofertilizante a base de un consorcio bacteriano. Mediante las referencias bibliográficas, se determinó que existen una gran cantidad de microorganismos capaces de producir los compuestos necesarios para aumentar y mejorar la producción agrícola, entre los cuales se encuentran las bacterias ***Pseudomona mendocina***, ***Exigobacterium aurantiacum***, ***Bacillus megaterium*** y ***Bacillus marisflavi***.

El presente trabajo tuvo como objetivo evaluar la melaza como medio de crecimiento no sintético para la producción y posterior escalado de un biofertilizante. Se realizaron cultivos en medio líquido a base de melaza al 6% de AR (Azúcares Reductores) con el fin de determinar si este medio era capaz de ser funcional para dicho producto. Se cuantificó la biomasa de cada microorganismo por separado mediante densidad óptica, asimismo se evaluó la viabilidad de cada microorganismo por recuento de placa (UFC) en medio agar-agar y melaza.

Como resultados del desarrollo del presente trabajo y habiéndosele dado cumplimiento a los objetivos del mismo, se obtuvo un promedio en la cinética mayor de 0.95 de acuerdo con el índice de regresión, con un número de Unidades formadoras de colonias (UFC) entre  $3.30E+04$  y  $2.80E+07$ , aplicando como parámetros iniciales una temperatura de  $28^{\circ}\text{C}$  y 170 rpm durante 7 horas y media. Estas condiciones fueron utilizadas para determinar los parámetros cinéticos de cada microorganismo como la velocidad máxima de crecimiento ( $\mu_{max}$ ), constante de saturación (***Ks***) y tiempo de duplicación, Con lo datos obtenidos se diseñó un modelo experimental y con estos resultados se elaboró un algoritmo de diseño tecnológico para 1L, 10L, y 100L de volumen útil para la producción del Biofertilizante.

## **Abstract**

A biofertilizer based on a bacterial consortium was developed on a bank scale. Through bibliographic references, it was determined that there are a large number of microorganisms capable of producing the necessary compounds to increase and improve agricultural production, among which are the bacteria *Pseudomonas mendocina*, *Exigobacterium aurantiacum*, *Bacillus megaterium* and *Bacillus marisflavi*.

The present work aimed to evaluate molasses as a non-synthetic growth medium for the production and subsequent scaling of a biofertilizer. Cultures were carried out in liquid medium based on molasses at 6% RA (Reducing Sugars) in order to determine if this medium was capable of being functional for said product. The biomass of each microorganism was quantified separately by optical density, also the viability of each microorganism was evaluated by plate count (CFU) in agar-agar medium and molasses.

As results of the development of this work and having met its objectives, a kinetic average greater than 0.95 was obtained according to the regression index, with a number of Colony Forming Units (CFU) between  $3.30E + 04$  and  $2.80E + 07$ , applying as initial parameters a temperature of 28 °C and 170 rpm for 7 and a half hours. These conditions were used to determine the kinetic parameters of each microorganism such as the maximum growth speed ( $\mu_{max}$ ), saturation constant (Ks) and doubling time. With the data obtained, an experimental model was designed and with these results an algorithm was developed. of technological design for 1L, 10L, and 100L of useful volume for the production of Biofertilizer.

# Índice de Contenido

Dedicatoria.....	i
Agradecimiento .....	ii
Resumen.....	iii
Abstract.....	iv
CAPÍTULO 1 Aspectos Generales.....	11
1.1 Introducción.....	11
1.2 Antecedentes .....	13
1.3 Justificación.....	14
1.4 Objetivos .....	15
1.4.1 Objetivo general .....	15
1.4.2 Objetivos específicos.....	15
CAPÍTULO 2 Fundamento Teorico.....	16
2.1 Medios de cultivos.....	16
2.1.2 Medios de cultivo no sintético.....	16
2.2 Consorcio bacteriano.....	18
2.2.1 Cinética microbiana .....	20
2.2.2 Factores que influyen en el crecimiento bacteriano .....	22
2.2.3 Mediciones del crecimiento bacteriano.....	23
2.3 Parámetros cinéticos .....	24
2.3.1 Diseño tecnológico de un escalado.....	26
2.3.2 Estrategia de escalamiento de un diseño tecnológico.....	29

CAPÍTULO 3 Metodología .....	37
3. Descripción del estudio .....	37
3.1 Preparación del medio no sintético .....	37
3.1.2 Clarificación de melaza. ....	38
3.1.3 Parámetros del medio no sintético .....	39
3.2 Conservación de los microorganismos.....	42
3.2.1 Preparación del inóculo.....	44
3.2.2 Cinética de crecimiento .....	45
3.2.3 Curva cinética de crecimiento .....	46
3.2.4 Concentración celular por conteo .....	47
3.3 Datos a nivel experimental .....	48
3.3.1 Determinación de parámetro cinéticos .....	48
3.3.2 Diseño tecnológico para la producción de un biofertilizante.....	49
3.3.3 Algoritmo sintetizado del diseño tecnológico.....	50
4. Resultados y discusión. ....	52
4.1 Definición de un medio no sintético para la producción de un consorcio bacteriano. ....	52
4.1.2 Azúcares reductores definidos en el medio no sintético.....	52
4.1.3 Proceso de crecimiento en medio sólido (Placa Petri) del consorcio bacteriano, del medio de cultivo Agar Miller LB a medio de cultivo no sintético Agar-agar y melaza al 6% de azúcares reductores.....	53
4.2 Cinética de crecimiento microbiano.....	55
4.3 Diseño tecnológico de un prototipo de biorreactor para la producción de un Biofertilizante. ....	61

4.3.1 Resultados y condiciones del modelo experimental a nivel de laboratorio (Erlenmeyer) para la obtención del Biofertilizante.....	64
Capítulo 5. Conclusiones.....	68
Capítulo 6. Recomendaciones.....	70
Capítulo 7. Bibliografías.....	71
Capítulo 8. Anexos .....	78

### Índice de Tablas

<b>Tabla 1.</b> Nutrientes esenciales en las células microbianas.....	16
<b>Tabla 2.</b> Nutrientes contenidos en 100 gr de melaza.....	18
<b>Tabla 3.</b> Microorganismos y Sus Aplicaciones Biotecnológicas.....	20
<b>Tabla 4.</b> Tabla de resultados del método volumétrico.....	53
<b>Tabla 5.</b> Datos del equipo del experimento a escala laboratorio.....	66
<b>Tabla 6.</b> Propuesta de un prototipo ajustables de parámetros del diseño tecnológicos para los volúmenes de expuestos.....	68

### Índice de Figuras

<b>Figura 1.</b> Mecanismo de Reacción.....	19
<b>Figura 2</b> Fase de Crecimiento Microbiano.....	21
<b>Figura 3.</b> Efecto de la concentración de sustrato sobre la velocidad de crecimiento bacteriano .....	25
<b>Figura 4.</b> Etapas del escalado.....	27
<b>Figura 5.</b> Semejanza geométrica del modelo y el prototipo .....	32
<b>Figura 6.</b> Esquema del fermentador de tanque agitado continuo.....	33
<b>Figura 7.</b> Relación entre el número de potencia y el número de aeración para las turbinas .....	34
<b>Figura 8.</b> Ubicación Piensa .....	37
<b>Figura 9.</b> Proceso de melaza decantada en Erlenmeyer de 1000 mL. Fuente:.....	39
<b>Figura 10.</b> Matraces de 100 mL de aforo con melaza a hidrolizar.....	40



<b>Figura 11.</b> (A: Adición de Fenolftaleína.), (B: Cambio de color de las muestras por NaOH), (C: Matraces previo a ser aforados).....	40
<b>Figura 12.</b> Muestra en agitación con reactivos de Fehling A y B.....	41
<b>Figura 13.</b> Crecimiento en medio de Agar Miller (LB): A ( <i>Pseudomona mendocina</i> ), B ( <i>Bacillus megaterium</i> ), C ( <i>Exiguobacterium aurianticum</i> ) y D ( <i>Bacillus marisflavi</i> ).....	42
<b>Figura 14.</b> Técnica de siembra de agotamiento por estrías.....	43
<b>Figura 15.</b> (A) Preparación del Medio de cultivo y (B) placa Petri con el medio ya solidificado al 6% de AR.....	44
<b>Figura 16.</b> Método de dispersión por superficie.....	44
<b>Figura 17.</b> (A) Inoculación con micropipeta de microorganismos, (B) Siembra de dispersión por superficie y (C) Inoculo en agitación en Shaker .....	45
<b>Figura 18.</b> Medición de absorbancia en el espectrofotómetro UNICO UV-2100 con una longitud de onda de 650 nm.....	46
<b>Figura 19.</b> Diluciones seriadas y conteo en placa Petri con medios de cultivos específicos para la población de interés.....	48
<b>Figura 20.</b> Crecimiento en melaza al 6% con Agar-agar (I) y crecimiento en agar Miller Lb (II): A ( <i>Bacillus megaterium</i> ), B ( <i>Bacillus marisflavi</i> ), C ( <i>Exiguobacterium aurianticum</i> ) y D ( <i>Pseudomona mendocina</i> ).....	55
<b>Figura 21.</b> Curva de absorbancia a 650nm, A ( <i>Pseudomona mendocina</i> ) B ( <i>Bacillus megaterium</i> ), C ( <i>Bacillus marisflavi</i> ) y D ( <i>Exiguobacterium aurianticum</i> ). Columna I: Fermentación con caldo LB. Columna II: Fermentación con Melaza.....	58
<b>Figura 22.</b> Curva de crecimiento de UFC en escala logarítmica: Columna I, crecimiento en Agar-Agar y Melaza. Columna II, crecimiento en Agar LB.....	61
<b>Figura 23.</b> Parámetros cinéticos de cada Bacteria que conforma el consorcio bacteriano.....	64
<b>Figura 24.</b> A. Modelo del experimento a nivel de laboratorio, B experimento a nivel de laboratorio.....	66
<b>Figura 25.</b> Diseño del Bioproceso partiendo de 100 mL hasta 100 litros de volúmenes efectivo en la producción del Biofertilizante.....	67

## Índice de Formulas

<b>Ecuación 1.</b> Velocidad de reacción .....	25
<b>Ecuación 2.</b> Tasa de Crecimiento.....	25
<b>Ecuación 3.</b> Tiempo de Generación .....	26
<b>Ecuación 4.</b> Dimensiones de Impulsores.....	31
<b>Ecuación 5.</b> Potencia de Agitación .....	32
<b>Ecuación 6.</b> Numero de Reynolds.....	32

<b>Ecuación 7.</b> Velocidad de Superficie.....	33
<b>Ecuación 8.</b> Potencia Empleada.....	34
<b>Ecuación 9.</b> Potencia Consumida.....	35
<b>Ecuación 10.</b> Calores Involucrados.....	35
<b>Ecuación 11.</b> Calor dispersado.....	35
<b>Ecuación 12.</b> Intercambio de Chaquetas.....	36
<b>Ecuación 13.</b> Calor Sensible.....	36
<b>Ecuación 14.</b> Método de Triplicado.....	41
<b>Ecuación 15.</b> Porcentaje de Azules Reductores.....	42
<b>Ecuación 16.</b> Velocidad Máxima de Crecimiento.....	49

### Índice de Anexos

<b>Anexo 1.</b> Cuadro de factores del método de Lane y Eylon .....	78
<b>Anexo 2.</b> Cuadro de absorbancias de cada bacteria que conforma el consorcio bacteriano con propiedades Biofertilizadoras .....	79
<b>Anexo 3.</b> Cuadro de Unidades Formadoras de Colonias (UFC) de cada bacteria que conforma el consorcio bacteriano con propiedades Biofertilizadoras .....	80
<b>Anexo 4.</b> Cuadros de parámetros cinéticos cada bacteria.....	81

### Abreviaturas

<i>a</i>	Área interfacial por unidad de volumen ( $m^{-1}$ )
$C_s$	Concentración del sustrato ( $Kmol/m^3$ )
$C_{sb}$	Concentración del sustrato en el interior de la solución ( $Kmol/m^3$ )
<i>D</i>	Diámetro del impelente (m)
<i>D(s)</i>	Coeficiente de difusión (m/s)
<i>Da</i>	Número de Damköhler
<i>DAB</i>	Difusividad de A en B ( $m^2/s$ )
<i>dCA</i>	Diferencia de concentración de A ( $mol/m^3$ )
<i>Di</i>	Diámetro del impelente (m)
$d_p$	Diámetro de partícula (m)
<i>Dt</i>	Diámetro del reactor (m)
<i>dz</i>	Diferencia de distancia en la dirección z (m)
<i>G</i>	Velocidad de masa ( $Kg/m*s$ )

JAZ	Flujo difusivo de A en la dirección Z ( $\text{mol/m}^2\cdot\text{s}$ )
$K_L$	Coefficiente de transferencia de masa (m/s)
$K_M$	Constante de Michaelis (Kmol/m)
L	Longitud (m)
N	Velocidad de agitación (rps)
$N_P$	Número de potencia
$N_s$	Velocidad de transferencia del sustrato (mol/s)
P	Potencia (W)
Re	Número de Reynolds
$r_{\text{max}}$	Máxima velocidad de reacción por unidad de volumen ( $\text{Kmol/m}^3\text{s}$ )
$r_p$	Velocidad de reacción por unidad de volumen ( $\text{Kmol/m}^3\text{s}$ )
rpm	revoluciones por minuto
RTD	Distribución del tiempo de residencia (por sus siglas en inglés)
Sh	Número de Sherwood
U	Unidades de actividad enzimática ( $\mu\text{g/mL}\cdot\text{min}$ )
V	Velocidad (m/s)
$\nu$	Viscosidad cinemática ( $\text{m}^2/\text{s}$ )
$X_s$	Fracción molar del sustrato

### ***Letras griegas***

$\rho$	Densidad ( $\text{kg/m}^3$ )
$\varepsilon$	Potencia por unidad de masa (W/g)
$\gamma$	Viscosidad cinemática ( $\text{m}^2/\text{s}$ )
$\mu$	Viscosidad dinámica ( $\text{Pa}\cdot\text{s}$ )

## **CAPÍTULO 1 ASPECTOS GENERALES**

### **1.1 Introducción**

El escalamiento consiste en una técnica de diseño, donde definimos a partir de un sistema pequeño un sistema grande (Peña, 2016). Es decir, que los datos y diseños resultados en escala de laboratorio son vitales para el escalamiento del proceso a un nivel superior. Según la asociación española de agronutrientes (2017) “Los biofertilizantes son productos a base de microorganismos benéficos del suelo, en especial bacterias y/o hongos, que viven asociados o en simbiosis con las plantas y ayudan de manera natural a su nutrición y crecimiento, además de ser mejoradores de suelo”. Un consorcio de microorganismo en un biofertilizante suministra a la planta a través de una mutua colaboración, simbiosis, los nutrientes necesarios para su desarrollo, principalmente nitrógeno, fósforo y fitohormonas.

Las bacterias con propiedades biofertilizadoras también se conocen como fijadoras de nitrógeno, los cuales son microorganismos que toman el nitrógeno atmosférico, lo transforman en nitrógeno orgánico y se lo entregan a la planta. (Santillan, 2016). Los biofertilizantes son una de las herramientas más importantes en la agricultura moderna y la agroalimentación, así como una fuerza económica impulsora en el futuro cercano (O`Connor, 2019).

En Nicaragua el sector agrícola representa uno de los mayores aportadores económicos, según datos del Banco Central de Nicaragua (BCN) el PIB de este sector alcanzó en el 2017 un 15.5%; debido a la importancia de esta actividad, la biotecnología tiene la responsabilidad de generar respuestas a las necesidades de este sector, así como la producción de un consorcio bacteriano con propiedades biofertilizadoras a una escala de mayor producción.

Nicaragua enfrenta el reto y la disyuntiva de producir suficientes alimentos para una población en crecimiento, pero al mismo tiempo implementar prácticas agrícolas sostenibles (O`Connor, 2019). Por lo tanto, esta investigación se enfoca en el desarrollo tecnológico de un escalamiento a partir de microorganismo aislados de bioinsumos a escala laboratorio. Así mismo este forma parte de una línea investigativa de Guillen &

Martínez (2019) y O`Connor (2019), donde previamente lograron descifrar, formular y seleccionar el consorcio bacteriano a partir de microorganismos que presentaron características de promoción del crecimiento vegetal conocidos como Plant Growth-Promoting Rhizobacteria (PGPR).

Con esta investigación pretendemos llegar a la producción de un biofertilizante a partir de un consorcio bacteriano, dicho producto es único en el país, ya que no se cuenta con registro de aplicación con dichos Microorganismo (MO). Además, este promoverá el uso de productos biotecnológicos amigables con el medio ambiente y de mayor rendimiento en su funcionamiento.

## 1.2 Antecedentes

Los datos obtenidos a nivel de laboratorio son el punto de partida para llevar un bioproceso hasta una escala superior (Collado, 2016). El escalamiento de un producto es de vital importancia para obtener una producción, donde se pretende conservar la calidad y efectividad obtenida en la escala menor de laboratorio. Por lo cual, el presente trabajo es la continuación de investigaciones que dieron resultados previos, al momento de selección de cepas para la producción de biofertilizante y su producción a escala de laboratorio, donde llegaron a las siguientes conclusiones y recomendaciones:

“La formulación del consorcio para un biofertilizante con las cepas seleccionadas ***Bacillus megaterium***, ***Bacillus marisflavi***, ***Exiguobacterium aurantiacum*** y ***Pseudomona mendocina***”, demostraron tener una cinética de crecimiento acelerado en laboratorio, alcanzando concentraciones máximas en un periodo que oscila entre 4.57 y 6.36 horas. La alta velocidad de crecimiento de las bacterias del consorcio permite hacer más eficientes los procesos, reduciendo los tiempos para la producción de metabolitos secundarios con propiedades fertilizantes y finalmente, colonizar el ambiente donde se inocula, para promover el crecimiento de la planta” (O`Connor, 2019). “Recomiendo evaluar la cinética de crecimiento en conjunto de las bacterias que conforman el consorcio microbiano con un medio de cultivo alternativo que contenga fuentes nutricionales de bajo costo y fácil disponibilidad en la región, para su posterior producción a escala piloto”. (Guillen & Martinez, 2019)

Es importante mencionar que la investigación de Guillen & Martínez (2019) y O`Connor (2019) no solo demuestran la eficacia de estos microorganismos como biofertilizante, sino también la necesidad de elaborar un medio económico (medio no sintético) para escalar la producción de dicho producto. La investigación de Pashova (1995) caracterizó y analizó la melaza nicaragüense, donde pudo concluir que esta presenta los nutrientes suficientes para promover el desarrollo de microorganismos (bacterias, levaduras y hongos), en la misma hace énfasis de la importancia de la melaza para procesos biotecnológicos, no solo por lo antes mencionado, sino también por el bajo costo de adquisición y su alta disponibilidad en el mercado nacional.

### 1.3 Justificación

Nicaragua es un país donde el sector agrícola aporta \$3,000 millones de dólares a la economía nacional (Guerrero, 2015). Según datos del BCN (2017), este sector aportó un 15.5% al PIB del país, la actividad agrícola desempeña un rol importante para las exportaciones e importaciones y por tal razón las investigaciones que promueven alternativas científicas que aporten mejoramiento en la practicas agrícolas, son de vital importancia para el desarrollo económico. (Peñata, 2015).

Las malas prácticas que se realizan con el uso de químicos y de microorganismos de montaña, llevaron a la búsqueda de una alternativa sostenible; O'Connor (2019) analizó 30 aislados de microorganismos a partir de bioinsumos elaborados en Nicaragua, donde concluyó seleccionando y aislando los microorganismos (***Bacillus megaterium***, ***Bacillus marisflavi***, ***Exiguobacterium aurantiacum*** y ***Pseudomona mendocina***) con los mejores resultados para crear un consorcio bacteriano con propiedades biofertilizadoras, donde Guillen y Martínez (2019) lo ejecutaron a escala laboratorio, por lo cual llevar este producto a una escala piloto para aumentar su producción brindará una alternativa al sector agrícola que con la producción una mayor escala de este biofertilizante, podrá disponer de un producto que le permita mejorar la productividad sin daños al ambiente y sin perjuicios para la salud humana.

## 1.4 Objetivos

### 1.4.1 Objetivo general

- Desarrollar a escala Banco un biofertilizante a base de un consorcio bacteriano (*Bacillus megaterium*, *Bacillus marisflavi*, *Exiguobacterium aurantiacum* y *Pseudomonas mendocina*) con propiedades biofertilizadoras y estimulantes del crecimiento vegetal.

### 1.4.2 Objetivos específicos

- Definir un medio no sintético ideal para ser utilizado en el proceso del crecimiento bacteriano.
- Determinar las condiciones de la cinética microbiana de cada microorganismo contenido en el consorcio bacteriano.
- Llevar los resultados previamente obtenido a nivel experimental a un diseño tecnológico prototipo para la producción de un biofertilizante



## CAPÍTULO 2 Fundamento Teorico

### 2.1 Medios de cultivos

Los microorganismos por lo general pueden vivir y multiplicarse sobre sustratos nutritivos. Los Medios de Cultivo son estériles contienen sustancias necesarias para el desarrollo de los microorganismos (Boci, 2020), están químicamente estructurados, tienen diferentes clasificaciones y un medio de cultivo de microorganismo debe de contener: micronutrientes, macronutrientes, hormonas de crecimiento y pH controlado. En la **Tabla 1** se muestran los nutrientes esenciales que las células necesitan.

**Tabla1.** Nutrientes esenciales en las células microbianas (Arévalo, 2017).

Elemento		Función
Potasio	K+	cofactor de ciertas enzimas
Magnesio	Mg <sup>2+</sup>	Cofactor de muchas enzimas
Calcio	Ca <sup>2+</sup>	Cofactor de ciertas enzimas
Hierro	Fe <sup>2+</sup> /Fe <sup>3+</sup>	En el citocromo y en ciertas enzimas
Manganeso	Mn <sup>2+</sup>	Cofactor de algunas enzimas
Molibdeno	Mo <sup>2+</sup>	Presente en la coenzima de varias enzimas
Cobalto	Co <sup>2+</sup>	Presente en la vitamina B12 y coenzimas relacionadas
Cobre	Cu <sup>2+</sup>	Presente en varias enzimas
Zinc	Zn <sup>2+</sup>	Presente en varias enzimas
Azúcar		Usada como fuente de carbono y de energía.

#### 2.1.2 Medios de cultivo no sintético

Los medios de cultivos generalmente son medios sintéticos donde están químicamente estructurados. Uno de los puntos del presente trabajo es obtener un medio de cultivo no sintético para el consorcio bacteriano, donde se busque un medio más económico y efectivo para el escalamiento eficaz de los microorganismos. En el trabajo de Guillen & Martinez (2019) el medio de cultivo utilizado fue Agar LB (Miller) para los M.O

(microorganismos) que forman el consorcio de biofertilizante, donde en el mismo se recomienda la búsqueda de un medio alternativo más económico.

Maldonado (1994) señala algunos ejemplos de medios potencialmente económicos, como: agua de coco, suero de leche, melazas, líquido de remojo de maíz, y harina de leguminosas como: chícharo, garbanzo, soya, haba; cereales como maíz, tubérculos como papa, desechos de bebidas como levadura seca y materias de origen animal como harina de pescado y harina de sangre entre los sólidos. De acuerdo con lo anterior, Maldonado (1994) determina la importancia de la búsqueda de materias primas y subproductos agroindustriales disponibles en cada región, donde los materiales posean características deseables en el contenido de nutrientes y un costo bajo.

Los medios de cultivos no sintéticos deben de satisfacer las necesidades básicas de cada microorganismo para la producción de metabolitos y biomasa (Mendizábal., 2012). Estos medios aparte de ser de bajo costo son amigables con el medio ambiente, pero se debe de considerar la precedencia de los insumos ya que Mendizábal (2012) determina que estos en ocasiones pueden contener sustancias tóxicas o metabolitos que pueden afectar el crecimiento del microorganismo.

**Medios de cultivo no sintético a partir de Melaza:** En Nicaragua la utilización de melaza como medio de cultivo no sintético es ideal, debido a que posee bajo costo de adquisición en el mercado nacional. Pashova (1995) caracterizó la melaza nacional demostrando que estas poseen concentraciones de nutrientes, ideales para el desarrollo de bacterias, levaduras y hongos (**Tabla 2**). En su estudio demostró que la composición de la melaza incluye diversas características fisicoquímicas que la favorecen como materia prima para procesos biotecnológicos.

Arnaldoa (2019) determinó en sus estudios de medios no sintético que la melaza cuenta con los nutrientes necesarios para ser considerada un medio de cultivo no sintético (**Tabla 2**) pero que un factor importante a considerar es el porcentaje de azúcares reductores contenido en este, ya que resultados inferiores a un 3 % inhibirían el crecimiento microbiano y un porcentaje mayor al 6 % lo haría de igual forma, estableciendo en sus conclusiones que el medio no sintético a partir de melaza es más óptimo cuando alcanza un porcentaje del 6 % de azúcares reductores. En procesos

fermentativos este porcentaje favorece el crecimiento de los microorganismos y la producción de metabolitos.

**Tabla 2.** Composición nutricional por 100 g de melaza (Noriega, 2014).

<b>Composición</b>	<b>Cantidad (gr)</b>	<b>CDR (%)</b>
Kcal	242	12.60%
Carbohidratos	69.6	22.40%
Proteínas	2.4	5%
Fibra	0	0%
Grasas	0.1	0.20%
<b>Minerales</b>	<b>Cantidad (mg)</b>	<b>CDR (%)</b>
Sodio	43	2.70%
Calcio	218	18.20%
Hierro	6.7	83.80%
Magnesio	0	0%
Fósforo	45	6.40%
Potasio	1238	61.90%

## 2.2 Consorcio bacteriano

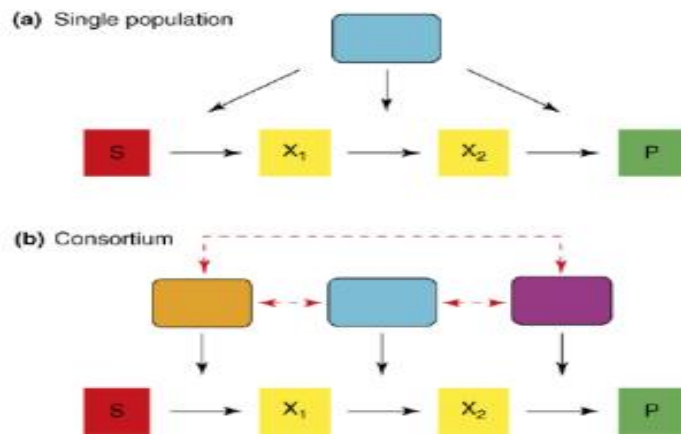
Los consorcios bacterianos son asociaciones naturales de dos o más especies que actúan como una comunidad, beneficiándose cada uno de ellos de la actividad de los demás. Es decir, se trata de sistemas en los que microorganismos de distintas especies, coexisten espacialmente y cooperan, posibilitando así la supervivencia de todos ellos. Los consorcios bacterianos cumplen una función importante en los tratamientos de aguas residuales y biorremediación de suelos (Moranto, 2015).

El empleo de biofertilizantes a bases de consorcios bacterianos está creciendo a nivel mundial con todas las restricciones de exportación e importación en los diferentes países y regulaciones de inocuidad que rigen su uso. La agricultura a nivel mundial está mirando hacia este tipo de productos que son más amigables con el ambiente y no tienen impactos negativos por lo que la producción de bioestimulantes está creciendo en el mercado exponencialmente, se tiene proyectado un crecimiento de más del 12 por

ciento a nivel mundial, este tipo de productos son los que modificarán la manera de hacer agricultura en un futuro no muy lejano (CONACYT, 2015).

**Características del consorcio Bacteriano:** Las bacterias seleccionadas para la producción del biofertilizante son: *Bacillus megaterium*, *Bacillus marisflavi*, *Exiguobacterium aurantiacum* y *Pseudomona mendocina*.

En la **Figura 1** podemos observar el mecanismo de reacción del consorcio bacteriano para la producción de un biofertilizante, dónde la melaza es el sustrato (S) que las bacterias metabolizan para llegar a la obtención del producto (P).



**Figura 1.** Mecanismo de Reacción (Moranto, 2015)

En la **Tabla 3**, se observan las características de cada microorganismo, para su uso de interés en la biotecnología y el código de cada microorganismo del banco de aislados del Programa de Investigación, Estudios Nacionales y Servicios del Ambiente (PIENSA) ubicado en la Universidad Nacional de Ingeniería en Managua, Nicaragua. Los cuales son los microorganismos por emplear:

**Tabla 3.** Microorganismos (M.O.) y Sus Aplicaciones Biotecnológicas (Guillén & Martínez, 2019).

Especie	Aplicaciones biotecnológicas de interés	Código LAB PIENSA
<b><i>Bacillus megaterium</i></b>	Presenta dos propiedades importantes asociadas con el crecimiento de las plantas, la solubilización de fosfato tricálcico y la producción de ácido indol acético (IAA). Otra característica es la producción de compuestos difusibles y volátiles que inhiben el crecimiento de dos fitopatógenos, <i>Alternaria Alternata</i> y <i>Fusarium Oxysporum</i> .	LS5-11B
<b><i>Pseudomona mendocina</i></b>	Aumenta significativamente la biomasa de los brotes y las raíces de lechuga y los contenidos de nutrientes foliares (P, Fe), incrementó los carbohidratos solubles en agua del suelo y el porcentaje de agregados estables. También tuvo un efecto significativo sobre las actividades de deshidrogenasa y fosfatasa.	PTLL4g
<b><i>Exiguobacterium aurantiacum</i></b>	Produce Acido Indol Acético (AIA) que contribuye al crecimiento de la cianobacterias de interés <i>Arthrospira platensis</i>	MVIB-02
<b><i>Bacillus marisflavi</i></b>	Presenta la capacidad de fijar nitrógeno y además también se demostró por el método de amplificación de PCR que posee fragmentos del gen nifH, este gen codifica la proteína de hierro y los genes nifDK que codifican la proteína de hierro molibdeno, estas dos proteínas conforman a la enzima nitrogenasa la cual cataliza la fijación de nitrógeno.	MIVB-01

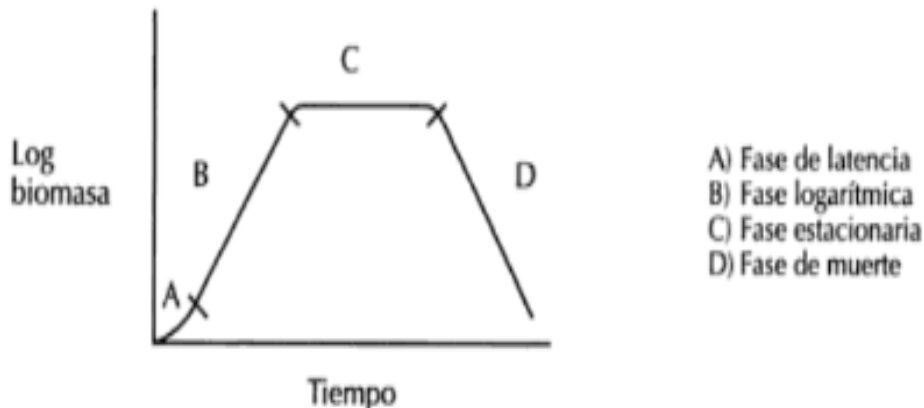
### 2.2.1 Cinética microbiana

**Generalidades:** Es muy importante estudiar y analizar el comportamiento cinético de cada microorganismo en específico, debido a que de ello depende el rendimiento del producto de interés. Gallegos (2014) define que la cinética microbiana es la que se encarga de entender todas las manifestaciones y reacciones de la vida microbiana: crecimiento, supervivencia, muerte, adaptaciones, formación de producto, ciclos celulares e interacciones con el medio ambiente.

Cuando el ambiente en el que se desarrollan estos microorganismos es óptimo para su crecimiento, se multiplican con tiempos de duplicación muy cortos. Por tanto, la tasa de aumento y el número total de células se duplica cada tiempo de duplicación que transcurre (CEUPE, 2019). Si nos referimos a “crecimiento microbiano” no hablamos del tamaño de la célula, si no, en realidad estamos hablando de cantidad de células.

El crecimiento microbiano puede verse influido por una diversidad de factores, tanto físicos como nutricionales; Valdés (2001) nos afirma que estos factores físicos incluyen: la concentración de iones hidrógeno (pH), la temperatura, la concentración de oxígeno, la humedad, la presión hidrostática, la presión osmótica y la radiación. Los factores nutricionales comprenden: la disponibilidad de carbono, nitrógeno, azufre, fósforo y otros minerales, y en algunos casos vitaminas.

**Fases de crecimiento:** Monod (1949) determina que el crecimiento de un cultivo bacteriano es una sucesión de fases, caracterizadas por las variaciones de la tasa de crecimiento. Las siguientes definiciones se muestran en la **Figura 2**.



**Figura 2 Fases de Crecimiento Bacteriano (Hernández, 2003).**

La **Figura 2** muestra el comportamiento de cada fase del crecimiento bacteriano, es importante mencionar que en ocasiones algunas de estas fases pueden estar ausentes o poco notables (Gallegos, 2014).

**A. Fase lag o fase de latencia:** La primera fase de este proceso es denominada Lag o fase de latencia, en la cual Ertola (1994) determina que el crecimiento del microorganismo no comienza inmediatamente después de la inoculación del medio de cultivo, si no que necesita un período de adaptación a las condiciones de cultivo, denominado fase lag o fase de latencia, durante esta etapa no hay división celular pero sí se da un aumento de la masa individual de los microorganismos debido a que se adaptaron al medio y se encuentra en síntesis de ARN, ribosa y enzimas. La duración de este período va en dependencia de la cantidad inicial de inóculo, edad y estado fisiológico de las células. (Hernandez, 2003)

**B. Fase logarítmica:** Según Trevan (1990) en su literatura, afirma que finalizada la fase lag, la concentración de biomasa ( $x$ ) comienza a aumentar en forma lenta y luego más rápidamente, hasta llegar a una etapa en la cual las células crecen a una velocidad específica máxima y constante ( $\mu_m$ ). Esta etapa se denomina fase logarítmica o fase exponencial, en esta fase se alcanza la máxima concentración microbiana ( $X_f = X_{max}$ ) (Hernández, 2003).

**C. Fase estacionaria:** En la fase estacionaria, la velocidad de crecimiento (reproducción) del microorganismo es igual a la velocidad de muerte y se llega a un equilibrio celular. La importancia de esta fase varía con el tipo de fermentación. Por ejemplo, si el objetivo de la fermentación es la producción de etanol, no es necesario (ni rentable) continuar el proceso cuando se alcanza la fase estacionaria, ya que una vez que obtiene la máxima concentración de las células, la producción de etanol disminuye. Por lo contrario, en la producción de antibióticos, la mayor acumulación se presenta en la fase estacionaria. (Hernández, 2003)

**D. Fase de declinación o muerte:** En esta última etapa, la concentración celular disminuye como resultado de la escasez de reservas de energía o por autólisis. (Parker, *et al.*, 1994)

### **2.2.2 Factores que influyen en el crecimiento bacteriano**

**Temperatura:** La temperatura es uno de los parámetros ambientales más importantes que condicionan el crecimiento y la supervivencia de los microorganismos. Como

sabemos, cada microorganismo tiene una temperatura mínima, óptima y máxima de crecimiento. A la temperatura óptima se alcanza la mayor velocidad de crecimiento de un microorganismo. Cuanto más distante de esa temperatura óptima sea la temperatura presente, menor será la velocidad de crecimiento y por lo tanto más lentamente se multiplicará ese microorganismo (Combase, 2018).

**pH:** El pH y la acidez es otro de los parámetros importantes que condicionan el crecimiento y la supervivencia de los microorganismos. Las diversas especies de bacterias presentan también un pH máximo, un pH mínimo y un pH óptimo. Los límites de pH en los que pueden crecer los microorganismos varían mucho según el tipo de microorganismos de que se trate: cuanto más alejado del pH óptimo de un determinado microorganismo sea el pH del medio, más lento será el crecimiento de dicho microorganismo.

Muchos microorganismos crecen a velocidad óptima alrededor de 7, pero pueden crecer bien entre pH 5 y 8. Hay sin embargo algunas excepciones: las bacterias acéticas, que tienen su óptimo entre pH 5,4 y 6,3 y las bacterias lácticas, cuyo óptimo se encuentra entre pH 5,5 (o incluso inferior) y 6 (Combase, 2018).

### **2.2.3 Mediciones del crecimiento bacteriano**

**Densidad Óptica:** El propósito de una medición de la tasa de crecimiento es determinar la tasa de cambio en el número de células en un cultivo por unidad de tiempo. Esto requiere estimar la densidad celular en una serie de puntos de tiempo. Ya sea que se realice con un lector de placas moderno o con el método clásico de matraz de agitación y espectrofotómetro, el número de células por mililitro de cultivo se estima a partir de la turbidez del cultivo que se mide con el lector de placas o espectrofotómetro y se estima como densidad óptica (DO). Idealmente, la densidad de cultivo real (células / mL) se puede inferir directamente de la DO (Fernández ,2012). Altas poblaciones de bacterias cambian la densidad óptica de un objeto y mantienen la luz a través de él. Las células con menos bacterias pueden permitir que más luz pase a través.

Para ver los resultados de estas pruebas, se utiliza un espectrofotómetro. Este dispositivo mide la cantidad de luz reflejada por un objeto en términos de longitudes de



onda. Una vez que la célula u otro material de ensayo se coloca en el interior del espectrofotómetro, pasa un haz de luz específico sobre la muestra y la lectura expresa los resultados, entonces se pueden determinar ciertas propiedades sobre la celda en cuestión, tales como la cantidad de bacterias que residen en el mismo (Fernández ,2012).

**Conteo del crecimiento bacteriano en placas Petri:** El conteo en placa Petri es el método más usado para contar poblaciones de bacterias. Donde un cultivo bacteriano en placas de petri se encuentra incorporada en el agar (Pour method) o puede que la muestra se disperse sobre el agar gelificado (Spread method). Cada célula o grupo de células incorporados en la muestra se reproducirá en sus múltiples alrededores para producir "colonias de células" separadas en el agar. Cada colonia es llamada unidad formadora de colonias (UFC). Este método es deseable porque arroja el total de células viables (solo células vivas); en contraste con el conteo microscópico y el conteo de peso seco (Pearson, 1976).

### 2.3 Parámetros cinéticos

Los parámetros cinéticos de crecimiento microbiano son las herramientas básicas para escalar los procesos biotecnológicos evaluados en el laboratorio, puesto que permiten predecir el desarrollo de la fermentación y evaluar los rendimientos y las productividades en los procesos. Los más importantes son: La velocidad específica máxima de crecimiento ( $\mu_{max}$ ), la constante de afinidad por el sustrato ( $K_s$ ), el tiempo en el que las bacterias se duplican y la cantidad de bacteria inoculada (Fernández, 2012).

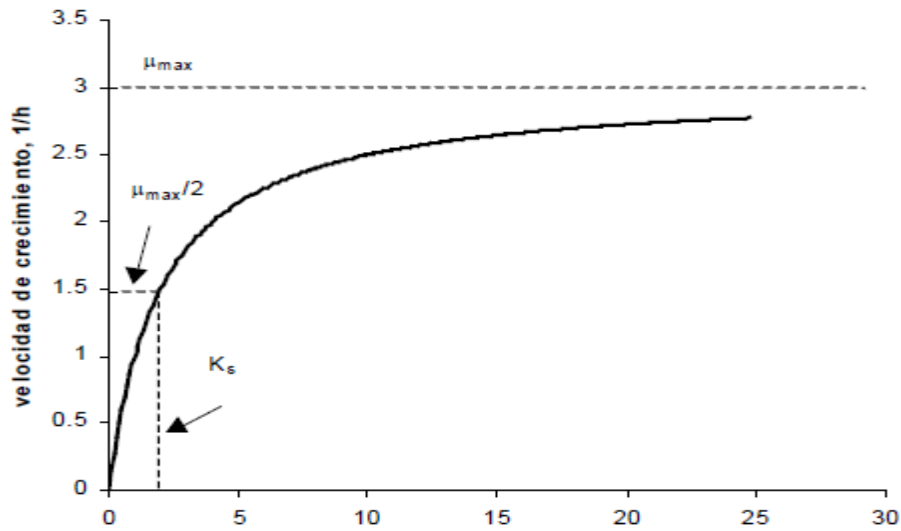
**Velocidad de reacción:** Chezeau & Vial (2019) describen que la ecuación empírica de Monod es la expresión de velocidad más común para describir el crecimiento de microorganismos en general y de bacterias productoras de hidrógeno en particular. Esto corresponde a una función hiperbólica en la que la tasa de crecimiento específico  $\mu$  ( $h^{-1}$ ) es solo una función de una única concentración de sustrato limitante y está sujeta a la saturación del sustrato cuando  $S \gg K_s$ :

$$\mu = \mu_{max} \frac{S}{S + K_S} \quad (1)$$

donde  $\mu_{max}$  es la tasa máxima de crecimiento específico,  $K_S$  es la constante de semisaturación de Monod (g / L) y S es la concentración del sustrato limitante (g / L). Esta expresión se puede generalizar a varios sustratos, de la siguiente manera para dos sustratos (Chezeau & Vial, 2019):

$$\mu = \mu_{max} \left( \frac{S_1}{S_1 + K_{S1}} \right) \quad (2)$$

Como Chezeau & Vial (2019) describieron en la **ecuación 1** que es semiempírica, es análoga a la de Michaelis-Menten. En efecto se deriva de suponer que una única enzima con una cinética del tipo Michaelis-Menten (**Figura 3**) es la responsable del consumo de S y conjuntamente que la cantidad de enzima o bien su actividad catalítica es lo suficientemente baja como para controlar el crecimiento (puede haber otras reacciones enzimáticas, pero sólo controla una de ellas).



**Figura 3.** Efecto de la concentración de sustrato sobre la velocidad de crecimiento bacteriano.  $\mu_{max}=3 \text{ h}^{-1}$ ,  $K_s=3 \text{ g/l}$  Fuente: (Chezeau & Vial, 2019)

Cuando  $s \rightarrow \infty$ , la velocidad  $\mu \rightarrow \mu_{max}$ , cuando  $s \rightarrow 0$ ,  $\mu \rightarrow 0$  y cuando  $s=K_s$ ,  $\mu=\mu_{max}/2$ .

De acuerdo con la ecuación  $\mu = Y_{xs} r_s$ , entonces:

$$r_s = Y_{xs} \mu$$

$$r_s = Y_{xs} \mu_{\max} s / (s + K_s)$$

En forma análoga la velocidad de un producto P puede expresarse como:

$$r_P = Y_{xp} \mu_{\max} s / (s + K_s) \quad (3)$$

### 2.3.1 Diseño tecnológico de un escalado

**Generalidades del escalado:** El escalado es el diseño y construcción de una unidad o conjunto de unidades de procesamiento a gran escala, tomando como base los cálculos y experimentos a pequeña escala (Ruiz, 2011). Es fundamental aumentar la producción donde la calidad y efectividad del producto se conserven.

Escalar de un laboratorio a una industria es posible, a partir de un análisis de los procesos de base biológica y de principios básicos ingenieriles; se tratan las biotransformaciones y las herramientas físicas de transporte y separación, desde la selección de productos, (Diaz, 2012). Por medio de los bioprocesos se pueden utilizar microorganismos para el desarrollo de productos, el reto de la biotecnología está en diseñar estos bioprocesos a una escala de producción mayor. En la **Figura 4**, se ilustra la forma de escalar de un microorganismo.



**Figura 4.** Etapas del Escalado (Ruiz, 2011).

**Fases de un escalado:** La Red de Revista científica para Latinoamérica (2008) define que el escalamiento es el proceso mediante el cual se desarrollan los criterios y las reglas de asignación numérica que determinan las unidades de medida significativas para llevar de un tamaño dado a otro tamaño mayor o menor una operación u objeto, escalar un proceso o equipo es convertirlo de su escala de investigación (laboratorio o piloto) a escala industrial.

Un escalado se divide en 4 fases fundamentales: Laboratorio, banco, piloto e industria. Donde el objetivo principal es ir aumentando la producción del bioproceso. Este proceso de ir de escala laboratorio a una superior no es tan simple; la red de revista científica (2008) da un ejemplo de los químicos alemanes, capaces de producir en el laboratorio muchas sustancias de muy alto valor comercial, que no eran capaces de reproducirlos a gran escala con la misma calidad, rendimiento y pureza. Era necesario ocupar modelos matemáticos, físicos, químicos y biológicos que permitan el desarrollo de modelos tecnológicos prototipos específicos para cada bioproceso.

**Biorreactores:** Un biorreactor es un recipiente (dorna) o sistema con condiciones controladas (de temperatura, oxigenación, presión, pH, concentración de gases y agitación) y propicias para el crecimiento del microorganismo que se cultiva (Guialab, 2020).

Garro (2019) menciona las características fundamentales que debe tener un biorreactor: Mantener las células uniformemente distribuidas en el cultivo, proporcionar un sistema de aireación adecuado para cubrir las necesidades metabólicas de los microorganismos, mantener constante y homogénea la temperatura y el pH, minimizar los gradientes de concentración de nutrientes, prevenir la sedimentación y la floculación. Garro (2019) especifica que un biorreactor debe cumplir con los siguientes objetivos:

1. Prevenir la sedimentación y la floculación.
2. Mantener un ambiente aséptico.
3. Reducir al máximo el tiempo del proceso.

**Factores para el diseño tecnológico:** Los procesos biotecnológicos son cada vez más importantes en el desarrollo de nuevos productos. Olivares (2018) determina que los principales factores que intervienen en el diseño de un modelo tecnológico son:

1. Requerimientos del Bioproceso y los microorganismos empleados.
2. Características e impacto del diseño del proceso.
3. Geometría de un reactor y selección del agitador.
4. Selección y diseño de los accesorios.
5. Optimización de costos de producción.

**Modo de operación:** Los bioprocesos o fermentaciones pueden ser clasificados en función de su operatividad en 3 grupos (Olivares, 2018):

**Operación discontinua (batch):** Sistema cerrado en el que en el inicio de la operación se añade la solución esterilizada de nutrientes y se inocula con el microorganismo, permitiendo que se lleve a cabo la incubación en condiciones óptimas de fermentación. En los procesos a escala industrial, se interrumpe la fermentación al final de la fase logarítmica (metabolitos primarios) o antes de que comience la fase de muerte (metabolitos secundarios). Se trata de un método robusto, bien conocido y que precisa de instalaciones simples.

**Operación alimentada (fed-batch):** Es básicamente similar a la fermentación discontinua, pero algunos sustratos se añaden escalonadamente a lo largo del proceso. Es un método robusto, bien conocido, que precisa de instalaciones simples. Ofrece una mejora en la producción.

**Operación continua:** En la fermentación continua se establece un sistema abierto. La solución nutritiva estéril se añade continuamente al biorreactor y una cantidad equivalente de cultivo con los microorganismos, se saca simultáneamente del sistema. Permite una buena utilización de los recursos materiales y humanos. Requiere una atención mucho mayor que los modos de operación anteriores para lograr el mantenimiento de la estabilidad (composición del sustrato y esterilidad del sistema).

### 2.3.2 Estrategia de escalamiento de un diseño tecnológico

Una estrategia particular del escalado es ejecutada para mantener un parámetro constante desde el laboratorio hasta el escalado de una planta de fermentación; la estrategia de escalado básico recomienda mantener  $k_L a$  constante (Aiba, et al., 1970; Jiménez, 1994; Gaitán & García, 1998).

El procedimiento ejecutado como referencia para el escalado será del trabajo realizado por Gaitán y García (1998). Para determinar los datos operacionales y diseño se usarán las correlaciones reportadas por Dorán (1999) para cada volumen como: diámetro interno del reactor, diámetro del impulsor, altura del líquido, altura del fondo del reactor al impeler, ancho del impeler, alto del impeler, ancho de los baffles y el valor experimental de  $k_L a$  en la fermentación del biofertilizante a base de 4 cepas.

Según Durango (2007) relata que una vez se calcule esta información se logrará determinar las condiciones adecuadas para cada escala garantizando valores adecuados en la agitación, aireación, caudal de aire y potencia cuyos datos proporcionarán un alto rendimiento en la producción de biomasa en el proceso fermentativo.

**Definición del tipo de reactor a utilizar según el tipo de microorganismo y el producto que se requiere obtener:** El tipo de reactor a utilizar es un reactor de tanque agitado continuo, en este el volumen de líquido se mantendrá constante por la igualación de los flujos de entrada y salida, (Doran, 1998), esto quiere decir que el caudal de cultivo fresco en la alimentación será igual al caudal de medio gastado en la salida. Los parámetros de operación para este reactor vienen determinados por los característicos en los reactores continuos, y estos son:

- ✓ La velocidad de dilución (D)
- ✓ La productividad volumétrica de biomasa ( $Q_x$ )
- ✓ Velocidad de dilución óptima ( $D_{opt}$ )
- ✓ Velocidad de dilución de vaciado ( $D_{crit}$ )

- ✓ Reynolds del rodete agitador (R)
- ✓ Coeficiente de transferencia de masa ( $k_L a$ )

De los parámetros antes mencionados el más importante es el de la velocidad de dilución (D), porque en estos equipos el estado estacionario se logrará cuando la velocidad específica de crecimiento celular sea igual al valor de la velocidad de dilución usada, por lo que de este valor dependerá la concentración de biomasa y sustrato en el equilibrio.

**Diseño del biorreactor:** En el diseño del biorreactor son utilizadas las modelaciones matemáticas y las técnicas de escalamiento propuesto por Usakun (2018). Según el balance de biomasa se llega

a:

$$FX_0 = FX + \frac{dX}{dt} \cdot V - r_X \cdot V$$

Esta ecuación es ajustada a un biorreactor, donde  $FX_0 = FX = 0$ , la ecuación de balance para el crecimiento microbiano será:

$$\int_{X_0}^X \frac{dX}{r_X} = \int_0^t dt$$

Expresada en velocidad específica de crecimiento ( $\mu$ ):

$$t = \int_{X_0}^X \frac{dX}{r_X}$$

Queda para una biorreacción en que cumpla con la de Monod:

$$t = \int_{X_0}^X \frac{K_s + S}{\mu_{m\acute{a}x} \cdot X \cdot S} \cdot dX \quad (4)$$

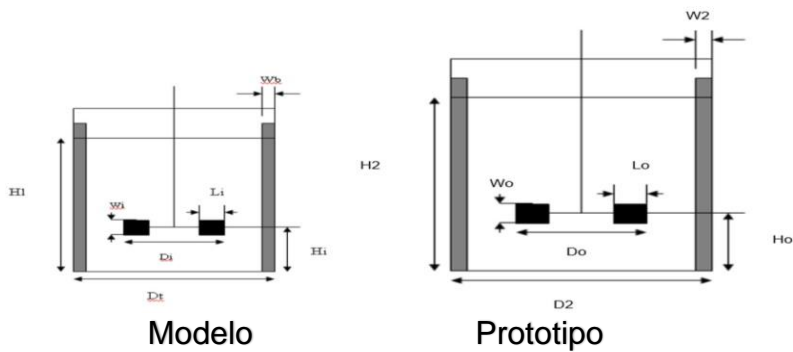
Siendo:

F = Velocidad del flujo volumétrico del medio. (m<sup>3</sup>/h)

r<sub>x</sub> = Velocidad de duplicación. (g/L<sub>h</sub>)

T = Tiempo de fermentación. (h)

Ya una vez establecido el tiempo de fermentación y las relaciones de magnitudes en el reactor modelo, se buscan los criterios de escalado más apropiado para el caso de estudio. En el sistema se mantiene el principio de semejanza geométrica (**Figura 5**) entre los modelos y el prototipo, pero en procesos biológicos es necesario además un criterio de escalado, que asegure el funcionamiento exitoso del prototipo. (RAJ, 2006).



**Figura 5.** Ejemplo de semejanza geométrica, donde se muestra que tanto el modelo como el prototipo guardan una similitud en forma y dimensiones (Doran, 1995).

Para este caso el criterio de escalado que marca el régimen de cambio es el de potencia consumida por el agitador por unidad de volumen del cultivo (Pg/V), para que sea llevado a efecto en la práctica existe la relación:

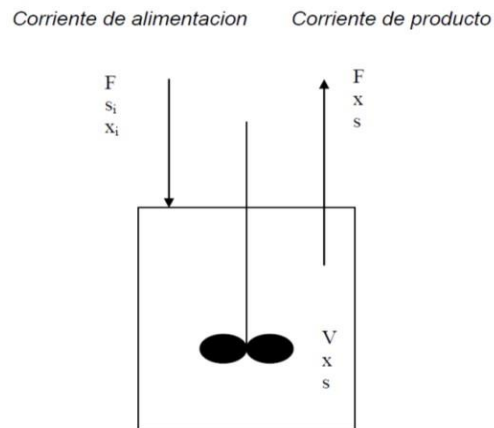
$$\frac{P_{\sigma 1}}{V_1} = \frac{P_{\sigma 2}}{V_2} \quad (5)$$

$$\pi \cdot N_1 D_{i1} = \pi \cdot N_2 D_{i2} \quad (6)$$



**Dimensionamiento del biorreactor:** Para el cálculo del dimensionamiento hay que tener en cuenta el espacio disponible en la planta. Las dimensiones se calculan con una relación de altura - diámetro (H:D) de 2:1 (BISWAS, 2014).

En la **Figura 6** se puede observar un esquema de un fermentador de tanque agitado continuo en donde se puede apreciar el balance de biomasa para un reactor continuo que opera en estado estacionario y cuya composición de salida es igual a la composición del líquido en el reactor.



**Figura 6.** Esquema del fermentador de tanque agitado continuo (Carlsson, 2015).

**Dimensionamiento de los impulsores:** Los impulsores son cuchillas planas, por lo que sus dimensiones se calculan con las ecuaciones siguientes (Carlsson, 2015):

$$H_a = 1 \cdot D_i$$

$$H_b = 2 \cdot D_i$$

$$H_c = 3 \cdot D_i$$

(7)

Se necesita que los impulsores estén ubicados estratégicamente dentro del biorreactor. donde:

$V_F$  = Volumen del biorreactor. ( $m^3$ )

$H$  = Altura. (m)

$D_F$  = Diámetro del biorreactor. (m)

$D_i$  = Diámetro del impulsor. (m)

$A_i$  = Ancho de las cuchillas. (m)

$D_d$  = Diámetro del disco. (m)

$L_i$  = Longitud de las cuchillas, desde el impulsor al primer cojinete. (m)

$H_a$  = Distancia entre el fondo del biorreactor al primer agitador. (m)

$H_b$  = Distancia del primer agitador al segundo agitador. (m)

$H_c$  = Distancia del segundo agitador al tercer agitador. (m)

Para el completamiento del diseño de un biorreactor prototipo se debe estimar el consumo de potencia de agitación y los calores involucrados en el proceso. Conociendo los calores que intervienen en la fermentación se puede conocer la masa del agente de calentamiento para mantener 35°C en el medio de cultivo (Wiley & Sons, 2018).

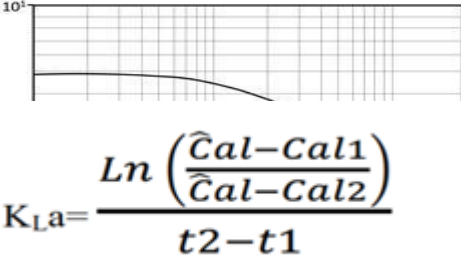
**La potencia consumida para la agitación:** Las relaciones de escalado son significativamente simples cuando se escala con semejanza geométrica y cuando el régimen de flujo del reactor de menor escala es completamente turbulento. El número de Reynolds (Re) para reactores agitados mecánicamente se define por la ecuación siguiente:

$$Re = \frac{\rho \cdot N \cdot D^2}{\mu_m} \quad (8)$$

El régimen de transición (**Figura 7**) de laminar a turbulento ocurre cuando  $Re \approx 100$  y el régimen turbulento ocurre cuando  $Re \geq 1000$ . La mayoría de los reactores agitados a escala industrial operan en régimen turbulento completamente desarrollado.

**Figura 7.** Relación entre el número de potencia y el número de aeración para turbinas (Rushton Doran, 1995).

La mayoría de los procesos fermentativos continuos necesitan de un sistema de agitación. Para estimar la potencia en un sistema aireado se hace uso de un módulo adimensional


$$K_{La} = \frac{\ln \left( \frac{\widehat{C}_{al} - C_{al1}}{C_{al} - C_{al2}} \right)}{t_2 - t_1} \quad (9)$$

llamado número de aireación. Este módulo se define como difusividad de oxígeno (Usaku, 2018):

Para el cálculo de la potencia se emplea la relación entre el número de potencia ( $N_p$ ) y  $N_a$ , se obtiene mediante la existencia de correlaciones empíricas para cada tipo de agitador (**Figura 7**).

$$P_g = n \cdot N_p \cdot \rho \cdot N^3 \cdot D^5 \quad (10)$$

siendo:

$Re$  = Número de Reynolds. (adimensional)

$\rho$  = Densidad del medio de cultivo. (kg/m<sup>3</sup>)

$\mu_m$  = Viscosidad del medio. (kg/m s)

$N_a$  = Módulo de aireación. (adimensional)

$Q_{\text{aire}}$  = Velocidad volumétrica del aire. (vvm)

$N$  = Velocidad del agitador. (rpm)

$n$  = número de impelente. (adimensional)

La potencia consumida de magnitudes estándares seguirá la formula derivada del número de Reynolds:

$$N_p = N_p' \frac{\left(\frac{D}{D_i}\right)^{0.5} \left(\frac{H}{D_i}\right)^{0.5} \left(\frac{I}{D_i}\right)^{0.3}}{\left(\frac{D}{D_i}\right)^{0.5} \left(\frac{H}{D_i}\right)^{0.5} \left(\frac{I}{D_i}\right)^{0.3}} \frac{\text{Condiciones de trabajo}}{\text{Condiciones estándar}} \quad (11)$$

siendo:

$N_p$  = Número de potencia de trabajo. (adimensional)

$N_p'$  = Número de potencia calculado. (adimensional)

$I$  = Ancho de los baffles.

**Balance de calor:** Los calores involucrados en el proceso de fermentación (RAJ, 2006).

Estos se clasifican en:

$$Q_{ac} = Q_{ag} + Q_{gen} + Q_{air} - Q_{sen} - Q_{int} + Q_{evap} \quad (12)$$

**Calor intercambiado con la chaqueta:** Por medio de un balance de calor en el sistema de proceso fluido térmico en la chaqueta se llega a la siguiente expresión.

$$Q_{int} = U \cdot A \cdot \Delta T \quad (13)$$

Siendo para cada ecuación:

$Q_{ac}$ = Velocidad de acumulación de calor. (kcal/h)

$Q_{ag}$ = Velocidad de generación de calor debido agitación. (kcal/h)

$Q_{air}$ = Velocidad de generación por aireación. (kcal/h)

$Q_{evap}$  = Velocidad de pérdida de calor por evaporación. (kcal/h)

$Q_{gen}$  = Velocidad de generación de calor metabólico. (kcal/h)

$Q_{int}$ = Velocidad de intercambio de calor en el biorreactor. (kcal/h)

$Q_{sen}$  = Velocidad de generación de calor sensible. (kcal/h)

$U$  = Coeficiente global de transferencia de calor. (kW/m<sup>2</sup> °C)

$\Delta T$  = Diferencia temperatura del medio de cultivo y el medio de enfriamiento. (°C)

$A$  = Área de transferencia de calor. (m<sup>2</sup>)

$C_p$  = Capacidad calórica (kcal/kg °C)

$m$  = Masa

## CAPÍTULO 3 Metodología

### 3. Descripción del estudio

**Localización del estudio:** Esta investigación se llevó a cabo en la ciudad de Managua, capital de Nicaragua; concretamente se realizaron los análisis generales en el laboratorio del Programa de Investigación, Estudios Nacionales y Servicios del Ambiente (PIENSA) ubicados en la Universidad Nacional de Ingeniería (UNI), con coordenadas (12°07'42.2"N 86°16'11.5"W). Para esta fase se utilizaron microorganismos aislados y previamente identificados por Guillén y Martínez (2019), que se encuentran disponibles en dicho laboratorio, como lo son: *Bacillus megaterium*, *Bacillus marisflavi*, *Exiguobacterium aurantiacum* y *Pseudomonas mendocina*, en esta fase se determinó el medio no sintético y parte de los parámetros para la cinética bacteriana previa al diseño tecnológico.



**Figura 8.** Ubicación Piensa (Fuente: GOOGLE MAPS).

#### 3.1 Preparación del medio no sintético

La conformación del medio no sintético se formó a partir de melaza; en la investigación de Arévalo (2017) analizó 7 medios de cultivos económicos, donde dicho medio de cultivo obtuvo los mejores resultados. Arévalo (2017) determina que la tasa de crecimiento más elevada en un cultivo bacteriano significa que un cultivo alcanza sus máximos números y masa totales de manera más rápida que en un ambiente pobre en

nutrientes. El rendimiento en cuanto a biomasa, o máxima masa total de un cultivo, es directamente proporcional a la cantidad de nutrientes. En la **Tabla 1** (fundamentos teóricos) se muestran los nutrientes esenciales que debe de contener un medio de cultivo bacteriano.

La melaza utilizada en la presente investigación proviene del Ingenio Benjamín Zeledón donde en la investigación de Pashova (1995) determinó los azúcares reductores de esta melaza en 15.3%, resultando la melaza con mejor rendimiento del país. La melaza se seleccionó como el medio de cultivo no sintético debido a su alto valor nutricional contenido en sí misma.

La **Tabla 1** (fundamentos teóricos) demuestra que la melaza cumple con los requerimientos necesarios para el desarrollo ideal de un microorganismo, planteado en la **Tabla 2** (fundamentos teóricos), por lo cual se procedió a utilizar la melaza como medio de cultivo no sintético.

### **3.1.2 Clarificación de melaza.**

Noriega (2014) explica que la clarificación de la melaza permite eliminar la mayor cantidad de impurezas presentes en el jugo mixto (barros, bagacillo, sales, coloides y material en suspensión), conservando la mayor cantidad de sacarosa y entregando el jugo a la etapa de evaporación en condiciones óptimas de pH, turbidez, color y temperatura (Noriega, 2014).

La melaza fue diluida en agua destilada en proporción 1:4, se llevó a 80 grados Celsius (°C), usando como medio de calentamiento agua destilada a temperatura de 85 °C en baño maría, introduciendo la solución en Erlenmeyer, llevándolo al termostato y con un termómetro se controló la temperatura de la melaza, una vez alcanzo los 80 °C, se dejó reposar por 3 horas a temperatura constante en el termostato. Finalizado el tiempo fueron sellados con papel de aluminio y llevados a la cabina de flujo laminar por 24 horas para sedimentar las impurezas. Transcurrido ese tiempo, estas impurezas se separaron por decantación en la cámara de flujo laminar para evitar contaminación (**Figura 9**). Una vez

sellados en matraces con papel de aluminio y recubierto con papel Parafilm, esta melaza clarificada se almacenó en el refrigerador hasta el momento de usarla (Páramo, 1997).



**Figura 9.** Proceso de decantación de la melaza clarificada en Erlenmeyer de 1000 mL (Fuente: Propia).

### 3.1.3 Parámetros del medio no sintético

**Azúcares reductores:** La determinación de azúcares reductores se ejecutó mediante las recomendaciones de Pearson (1976). En la investigación de Arnaldoa (2019) se describe la importancia de controlar los azúcares reductores (AR) en la melaza como medio de cultivo. Estos deben de mantener los AR entre los rangos del 3% al 6%, ya que un rango inferior o superior a los mencionados inhibirán la fermentación. En su escalamiento de producción de biomasa de *Candida utilis* observó que la producción en biorreactores aumentaba conforme el sustrato se aproxima más al contenido del 6 % de AR.

**Determinación de azúcares reductores por el método de Lane y Eynon:** Este método consiste en determinar el volumen de disolución de azúcar que se necesita para reducir 10 o 25 mL de disolución de Fehling, en presencia de azul de metileno como indicador interno (Pearson, 1976). Para la determinación de azúcares reductores presentes se utilizó una melaza en dilución 1:4, inicialmente se realizó una hidrólisis (**Figura 10**) y a continuación la valoración de la disolución de azúcar, utilizando una melaza con una concentración al 20%,

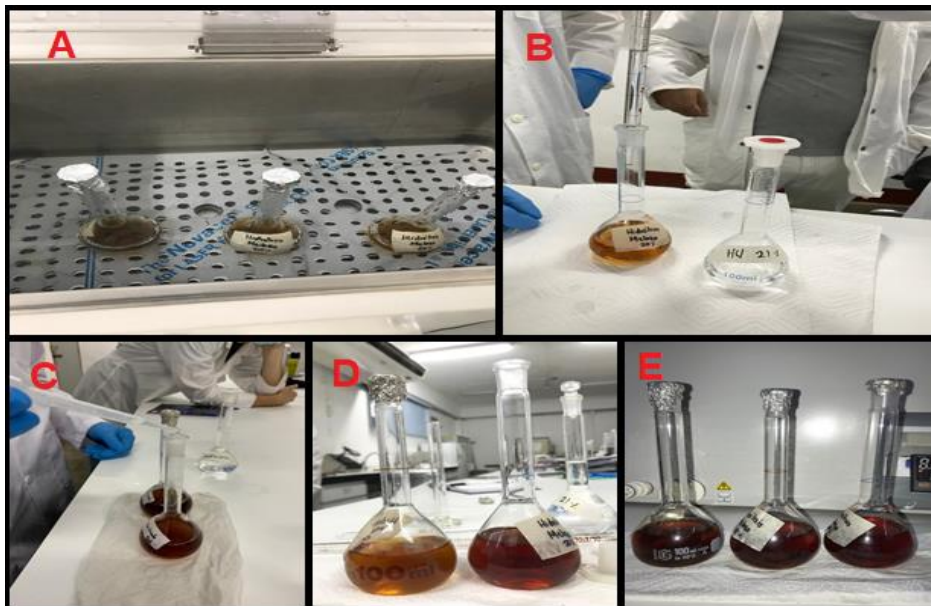


se colocaron 3 matraces de 100mL de aforo, se agregaron 50 mL de agua destilada y 1mL de la melaza clarificada.



**Figura 10.** Matraces de 100 mL de aforo con melaza a hidrolizar (Fuente: Propia).

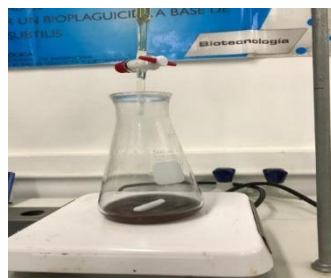
Se colocaron en baño María (**Figura 11 A**) hasta 68°C. Posteriormente se añadieron 10mL de HCl al 21% (**Figura 11 A**) y se calentaron por media hora a la misma temperatura.



**Figura 11.** (A: Muestras en baño maría a 68 °C). (B: Adición de HCl a las muestras) (C: Adición de Fenolftaleína.), (D: Cambio de color de las muestras por NaOH), (E: Matraces previo a ser aforados) (Fuente: Propia).

Se enfriaron y se adicionaron unas gotas de fenolftaleína (**Figura 11 C**) y calentaron una vez más hasta 68°C. Seguidamente se agregaron gotas de NaOH al 40% hasta alcanzar coloración roja (**Figura 11 E**) (Pearson,1976). Después se llevaron las muestras a pH alcalino, se enfriaron nuevamente y se aforaron.

**Valoración utilizando un volumen inicial de 10 mL de solución Fehling:** Para iniciar la valoración, se utilizó una de las muestras hidrolizadas, se llenó una bureta de 25mL con la disolución de azúcar. Posteriormente, se agregó en un Erlenmeyer 5mL de reactivo de Fehling A, 5mL de Fehling B y 5mL de disolución de azúcar de la bureta. (Pearson,1976). Se calentó el Erlenmeyer utilizando un hot plate (Fisher Scientific Isotemp Heated Magnetic) y se agitó con una barra magnética hasta que el líquido hierva suavemente durante 90 segundos (**Figura 12**).



**Figura 12.** Muestra en agitación con reactivos de Fehling A y B (*Fuente: Propia*).

Transcurrido este tiempo, se añadieron 5 gotas de azul de metileno al 1% y se inició la adición de disolución de azúcar a un ritmo de 0.25 mL cada 15s. El líquido se debe agitar y mantener en constante ebullición (Pearson, 1976). Se continuaron las adicciones de disoluciones de azúcar hasta la desaparición del color azul. Este método se realizó por triplicado; a los resultados obtenidos en el triplicado fueron simplificados mediante una media aritmética, este es el valor que se obtiene al sumar todos los datos que tenemos y dividir el resultado entre el número total, tal y como se muestra en la **ecuación 14**.

$$\bar{X} = \frac{x_1 + x_2 + x_3 + x_4 + \dots + x_n}{N} \quad (14)$$

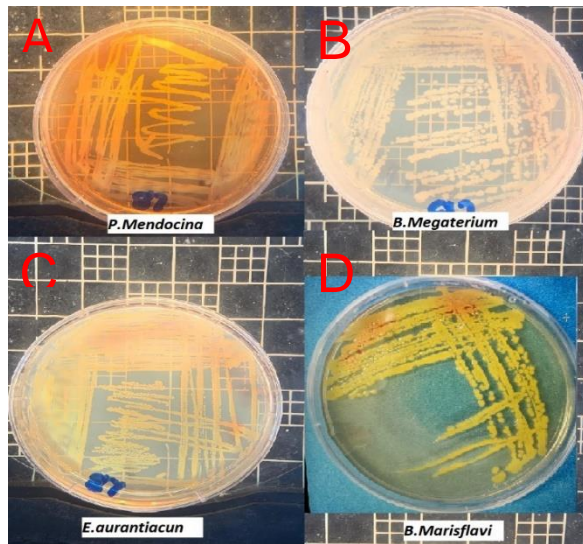
El cálculo del porcentaje de azúcares reductores en la disolución se realizó con la siguiente expresión:

$$\%AR = \frac{Factor}{[(Vmuestra)(Título)]} * 10 \quad (15)$$

Donde *V muestra* es el volumen de la muestra, *Título* representa el volumen de disolución de azúcar (solución a titular) utilizados en la valoración, y *Factor* es el valor correspondiente al *Título*. Utilizando el cuadro de factores del método de Lane y Eylon se puede observar (**Anexo 1.**) que se presenta la relación entre *Titulo* y *Factor* (azúcar invertido no sacarosa) (Pearson, 1976).

### 3.2 Conservación de los microorganismos

Las cepas *Bacillus megaterium*, *Bacillus marisflavi*, *Exiguobacterium aurantiacum* y *Pseudomona mendocina* (**Figura 13**). que se utilizaron en este estudio fueron suministradas por el Laboratorio de Biotecnología del Programa de Investigación Estudios Nacionales y Servicios Ambientales (PIENSA – UNI)



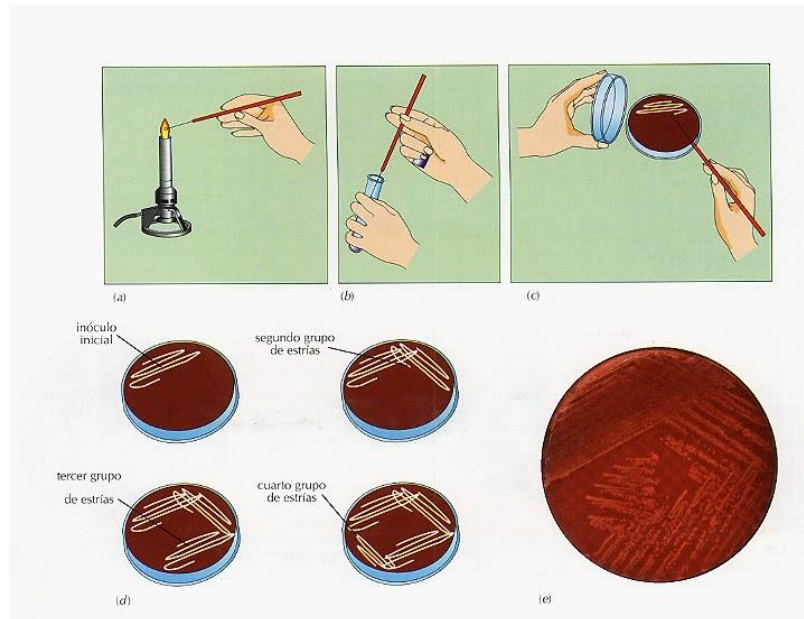
**Figura 13.** Crecimiento en medio de Agar Miller (LB): A (*Pseudomona mendocina*), B (*Bacillus megaterium*), C (*Exiguobacterium aurantiacum*) y D (*Bacillus marisflavi*). (Fuente: Guillén & Martínez, 2019).

Estas cepas se conservan mediante el método de transferencia periódica tal y como se muestra en la **Figura 13**. La transferencia de las bacterias se efectúa cada 30 días utilizando el medio Agar Miller (LB). Estas bacterias se encuentran conservadas a una temperatura de 10°C (Guillén & Martínez, 2019).

Loaiza (2014) describe que en este método la cepa microbiana se almacena en forma de cultivo activo en el medio en el que ha crecido, consiste en la transferencia del cultivo a un medio de cultivo nutritivo y fresco a intervalos que aseguren la viabilidad de este.

La multiplicación para cada una de las 4 cepas se realizó en medio agar Miller LB a partir de los microorganismos aislados y obtenidos del banco de células de trabajo. Para esto Sanz (2011) describe la técnica de siembra de agotamiento por estrías, la cual se realiza con el objetivo de obtener cultivos puros, por lo tanto, se empleó dicha técnica, la cual se extrajo del trabajo realizado por Guillén & Martínez (2019). Ver a continuación

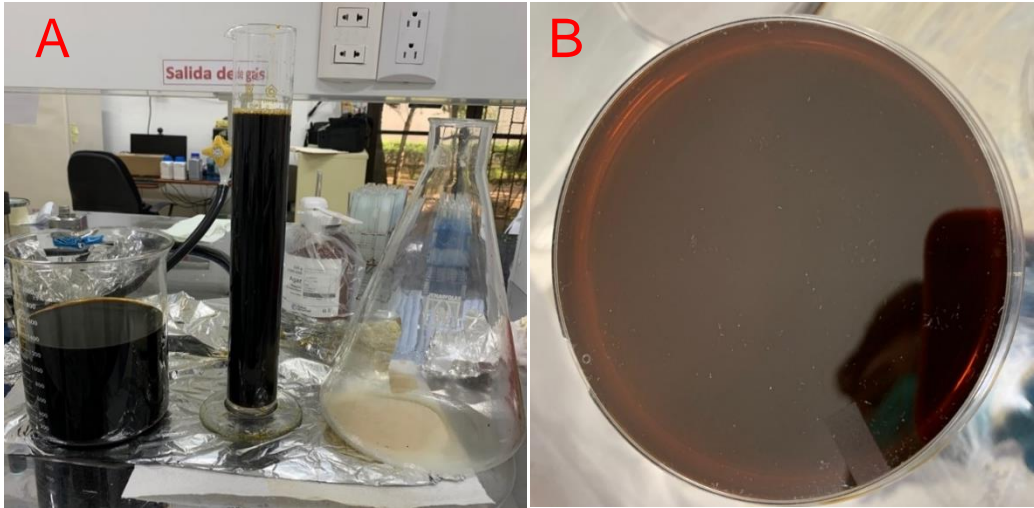
**Figura 14.**



**Figura 14.** Técnica de siembra de agotamiento por estrías (Fuente: Martínez, 2019).

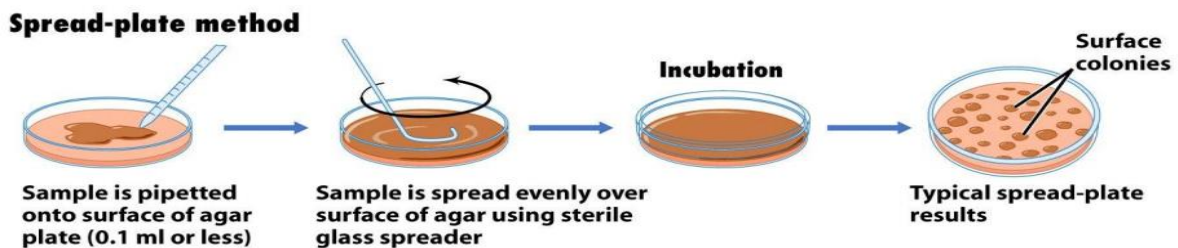
### 3.2.1 Preparación del inóculo.

Con el objetivo de adaptar las bacterias al medio de cultivo no sintético, se procedió a transferir las bacterias contenidas en el medio Agar Miller (LB) a un medio sólido compuesto por Agar-agar y melaza (melaza clarificada con 6% de azúcares reductores). En la **Figura 15** se muestra la preparación del medio de cultivo y una placa Petri con el medio ya solidificado.



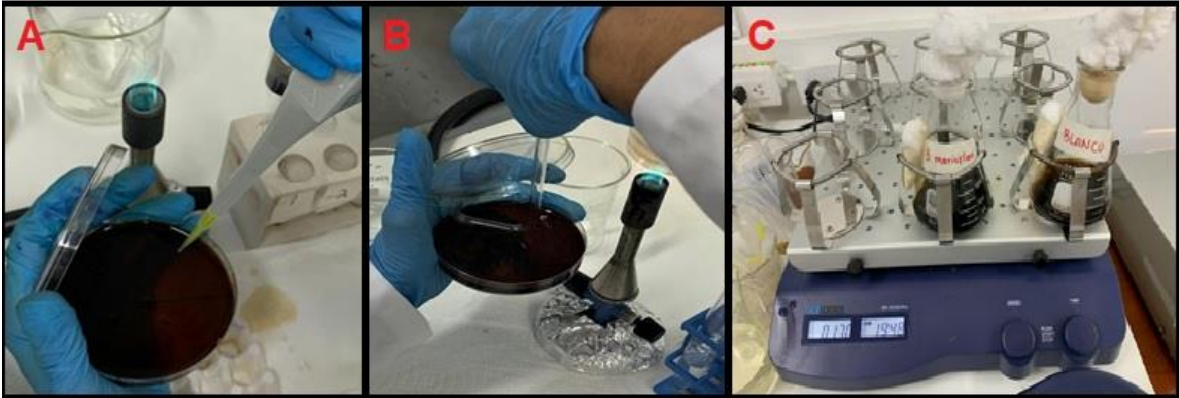
**Figura 15.** (A) Preparación del Medio de cultivo y (B) placa Petri con el medio ya solidificado al 6% de AR (Fuente: Propia).

Para la transferencia de estas bacterias se realizó la técnica de siembra en superficie, siguiendo la metodología de Santambrosio (2009), para ello se vierte sobre una placa de Petri el medio de cultivo fundido, se deja solidificar y se coloca el inóculo sobre la superficie de la placa. Las muestras se siembran extendiéndolas con ayuda de un asa de Digrafsky de cristal estéril, tal y como se muestra en la **Figura 16**.



**Figura 16.** Método de dispersión por superficie (Santambrosio, 2009).

La suspensión se absorbe en el agar, dejando las células microbianas sobre la superficie. Las placas se incuban hasta la aparición de las colonias. Como en el método de siembra por estría, las colonias que aparecen en las placas sembradas por extensión o en el agar solidificado sembrado por el método del vertido en placas presenta la ventaja de que permiten obtener un mayor número de colonias aisladas que el método de siembra por estría (Santambrosio, 2009).



**Figura 17.** (A) Inoculación con micropipeta de microorganismos, (B) Siembra de dispersión por superficie y (C) Inóculo en agitación en Shaker (*Fuente: Propia*).

Del crecimiento obtenido de cada una de las cepas en placa Petri, se vertieron 2 mL de agua destilada estéril con ayuda de una micropipeta (**Figura 17 A**) para poder dispersar los microorganismos utilizando un asa Digralsky (**Figura 17 B**) y así ser transferidos 2 mL del contenido microbiano en la placa Petri a un matraz Erlenmeyer con capacidad de 250 mL de aforo con contenido de 50 mL de melaza a 6% de azúcares reductores (**Figura 17 C**). Estos se dejaron en agitación durante 16 horas en un Shaker de laboratorio marca SCILOGEX SK-O330-Pro, a una velocidad de 170 rpm y una temperatura de 30°C. Se realizó el mismo procedimiento para cada una de las bacterias.

### 3.2.2 Cinética de crecimiento

Una vez transcurridas las 16 horas del inóculo, se tomaron 10 mL de este, para transferirlos a un matraz Erlenmeyer con capacidad de 250 mL de aforo con contenido de 90 mL de melaza. Estos se mantuvieron en agitación en un Shaker de laboratorio

marca SCILOGEX SK-O330-Pro, a una velocidad de 170 rpm durante 7 horas y media a 28°C, este tiempo fue tomado por los resultados obtenidos de Guillén y Martínez (2019).

En este tiempo establecido se midió la absorbancia en el espectrofotómetro UNICO UV-2100 con una longitud de onda de 650 nm, como se muestra en la **Figura 18**, se utilizaron Erlenmeyers con medio de melaza como prueba testigo para medir la absorbancia y determinar la calidad del proceso. Lo descrito se realizó por triplicado para cada bacteria.



**Figura 18.** Medición de absorbancia en el espectrofotómetro UNICO UV-2100 con una longitud de onda de 650 nm (*Fuente: Propia*).

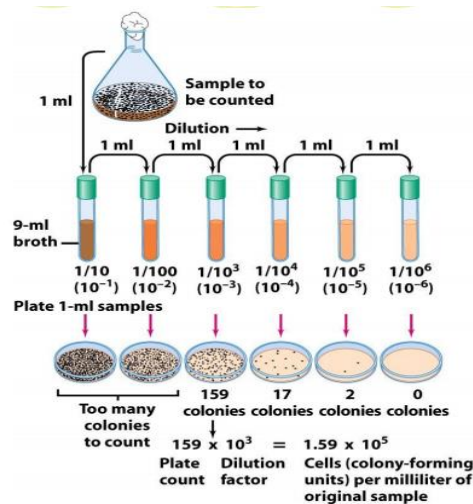
### 3.2.3 Curva cinética de crecimiento

La propuesta de Páramo (2012) y Kova´Rova´-Kovar & Egli (1998) determina que para dar inicio con la corrida se debe medir la absorbancia en el espectrofotómetro UNICO UV-2100 con una longitud de onda de 650 nm para cada uno de los frascos Erlenmeyer inoculados al tiempo cero y se debe realizar la técnica de medición cada 30 minutos durante 7 horas y media para cada bacteria por triplicado. Los resultados obtenidos de la medición se proyectaron mediante una media de cada corrida ejecutada, tal y como se muestra en **Anexos 2**.

### 3.2.4 Concentración celular por conteo

El conteo celular es un paso necesario cuando se efectúan siembras o subcultivos celulares, o cuando se preparan experimentos para ensayos basados en células. La forma de cuantificar las células viables más utilizada en microbiología, es la de hacer diluciones y cuenta en placa con medio de cultivo específicos para la población de interés como se muestra en la **Figura 14** antes explicada. Esta técnica se basa en la suposición de que cada bacteria incluida en un medio de agar, en su superficie se multiplicará y producirá una colonia visible, en consecuencia el número de colonias que se observarán a simple vista será igual al número de bacterias viables o unidades formadoras de colonias (UFC) inoculadas en el agar multiplicadas por la dilución (Ramos & Pérez, 2004).

Se tomó cada 30 minutos un 1mL de volumen de la muestra para la realización de diluciones seriadas desde -1 hasta -6. Tomando de las mismas 100 µL para distribuirse sobre las placas Petri preparadas con medio Agar-agar y melaza realizándose este por triplicado, tal y como se muestra en la **Figura 19**. Una vez inoculadas las placas, se incubaron a 30°C por 16 horas. Transcurridas las 16 horas, se procedió a realizar el conteo celular de cada dilucion en sus tiempos establecido según la cinetica de crecimiento por triplicado.



**Figura 19.** Diluciones seriadas y conteo en placa Petri con medios de cultivos específicos para la población de interés (Ramos & Pérez, 2004).



Madhumathi (*et al.*, 2019) explican que para determinar el número de UFC (unidades formadoras de colonias) por mililitro (mL) de muestra, el número de colonias (en una placa que tiene 30-300 colonias) se multiplica por el número de veces que se diluyó el mL original de bacterias (se contó el factor de dilución de la placa). Por ejemplo, si una placa que contiene una dilución 1 / 1,000,000 del mL original de muestra contiene 150 colonias, entonces 150 representa 1 / 1,000,000 del número de UFC presentes en el mL original. Por lo tanto, el número de UFC por mL en la muestra original se calcula con la fórmula representada en la **Figura 19**:

**UFC por ml de muestra = El número de colonias contadas X El factor de dilución de la placa contada**

Aplicando la técnica descrita se procedió a construir el **Anexo 3**, donde se determinó el conteo en placa petri para cada bacteria en relación a cada tiempo.

### **3.3 Datos a nivel experimental**

En este punto mediante el análisis de los datos obtenidos a nivel de laboratorio permitió obtener un modelo matemático para la curva de calibración y extrapolar a otros procesos en nuevas condiciones.

#### **3.3.1 Determinación de parámetros cinéticos**

Los parámetros cinéticos son criterios que sirven para evaluar y comparar un proceso con otro, estos también son el punto de partida a considerar en un diseño de escalamiento Hernández (2003). Se logró determinar la velocidad máxima de crecimiento, conocer las horas que dura cada una de las fases, saber la concentración de UFC/ mL en cada una de las fases y podremos conocer cómo va disminuyendo el sustrato en el tiempo (Paramo, 2020).

**Velocidad de crecimiento:** Chezeau & Vial (2019) describen que la ecuación empírica de Monod es la expresión de velocidad más común para describir el crecimiento de microorganismos en general, la velocidad de crecimiento de los microorganismos fue calculada mediante la aplicación de la **Ecuación 1** (Fundamentos teóricos)

**Máxima velocidad de crecimiento:** Para determinar la velocidad de crecimiento del microorganismo, se asume una reacción de orden uno y se grafica el algoritmo natural (**Anexo 3**) de la concentración celular ( $\ln x$ ) contra el tiempo ( $t$ ) de la fase exponencial. La pendiente de esta línea corresponde a la máxima velocidad específica de crecimiento ( $\mu_{\text{máx}}$ ) (Durango, 2007).

**Crecimiento microbiano:** El crecimiento microbiano se modeló según la ecuación de Monod. Esta ecuación relaciona la velocidad máxima de crecimiento con la concentración del sustrato limitante (**Anexo 4**) (Sidhu *et al.*, 2014).

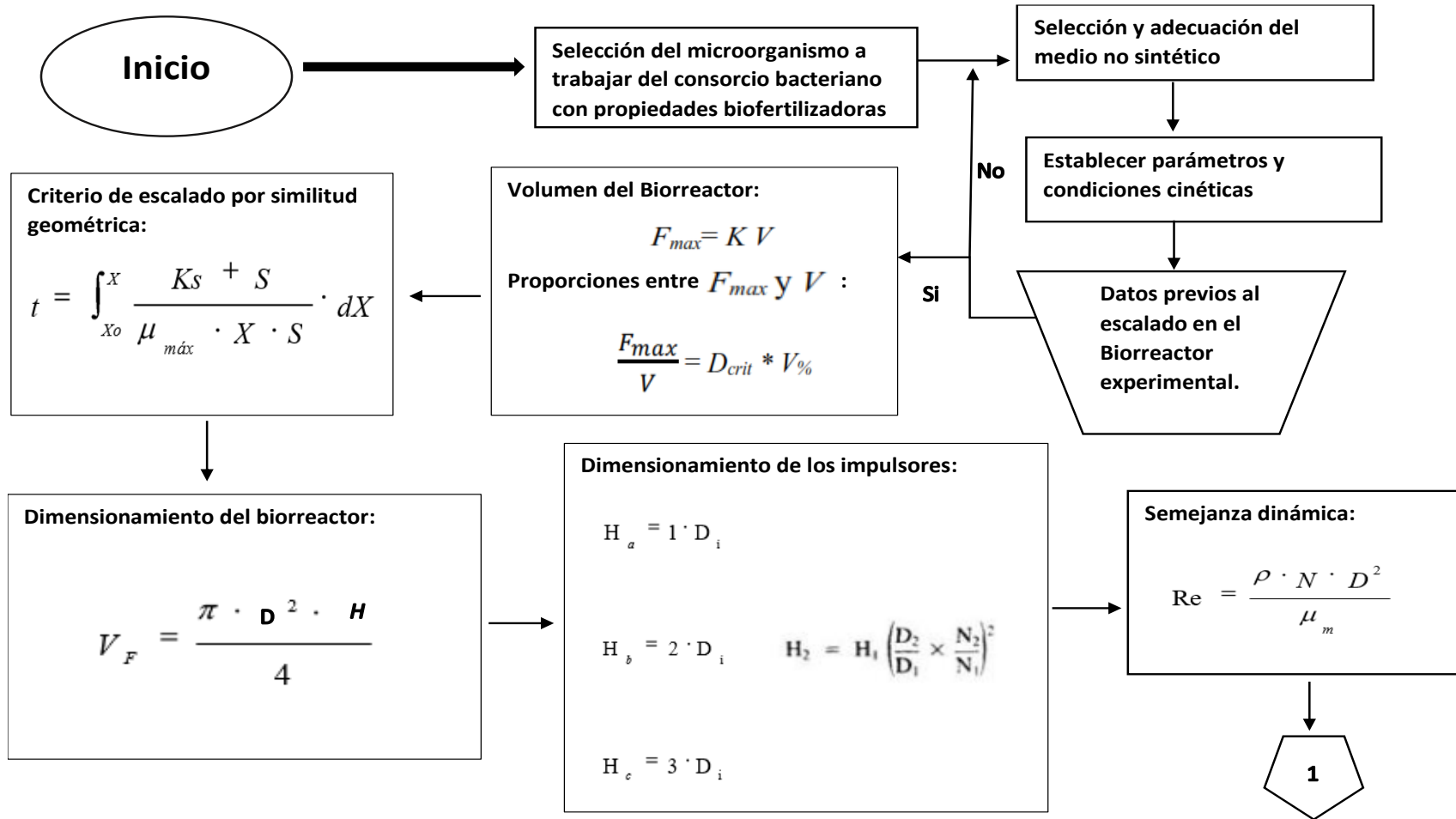
$$\mu = \mu_{\text{max}} \frac{S}{K_S + S} \quad (16)$$

**Tasa de crecimiento y tiempo de generación:** La tasa de crecimiento y tiempo de generación son los parámetros a controlar durante la fermentación, ya que representan el comportamiento dinámico de los microorganismos. El uso de una tasa de crecimiento como parámetro de control implicaría que el sustrato está presente en cantidades suficientes y, por lo tanto, también puede actuar como una herramienta indirecta para el control del entorno extracelular (Srivastava & Gupta, 2011). La estimación de la tasa de crecimiento y el tiempo de generación se realizó utilizando modelos apropiados explicados en el capítulo de fundamentos teóricos basados en la cinética de crecimiento celular (Anexo 4).

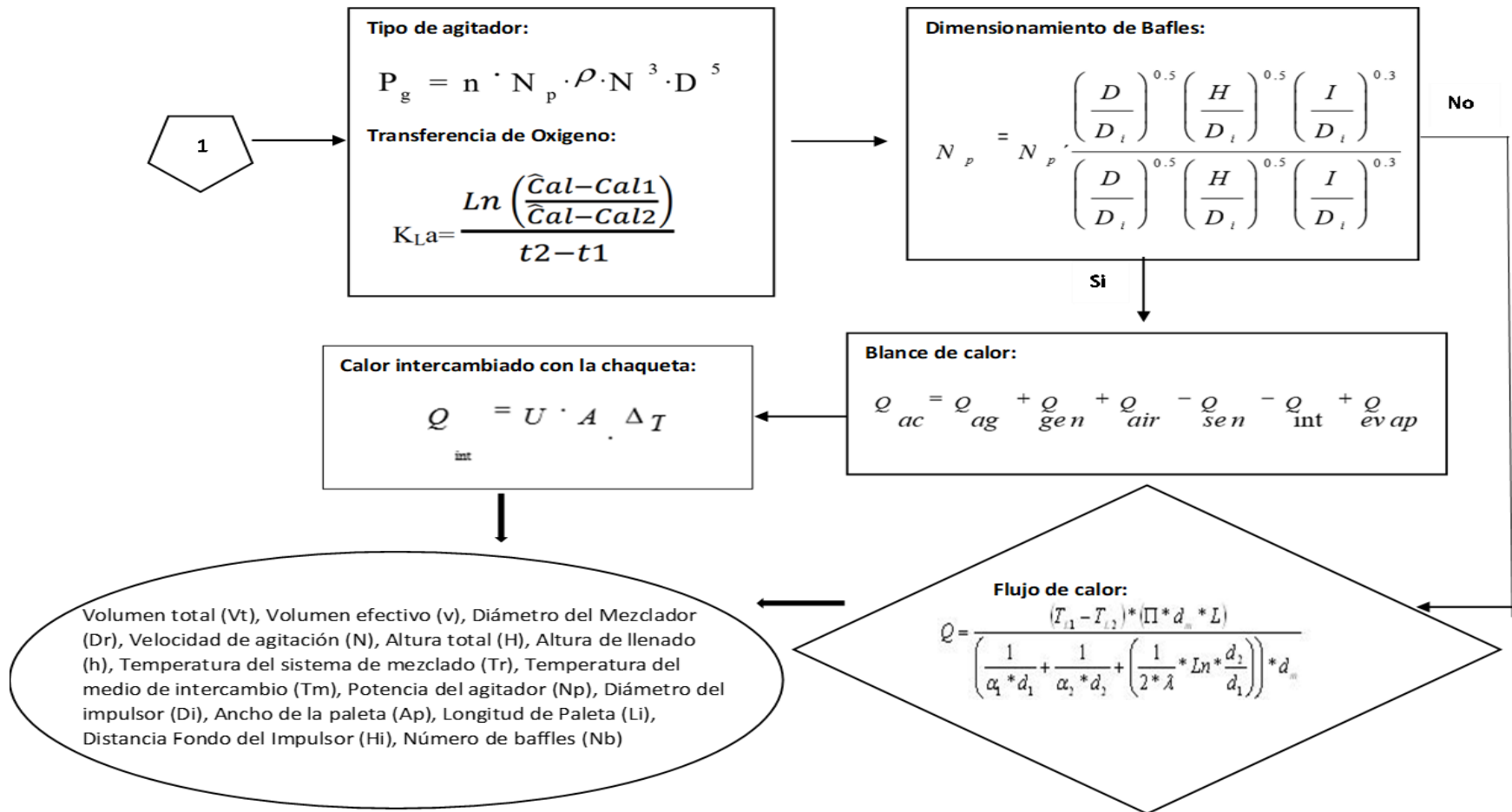
### 3.3.2 Diseño tecnológico para la producción de un biofertilizante

El diseño tecnológico del presente trabajo se realizó mediante las fórmulas propuestas en el capítulo de fundamentos teóricos, este es resumido en un algoritmo sintetizado (**Flujograma 1**) que sigue la secuencia de ejecución de este bioproceso en específico. El orden de cada proceso y fórmula fueron realizadas según las características y exigencias que se requieren para la producción de un Biofertilizante y su escalamiento.

3.3.3 Algoritmo sintetizado del diseño tecnológico.



Escalado del proceso de producción de un biofertilizante a base de un consorcio bacteriano



**Flujograma 1**, Proceso para el diseño tecnologico del escalado (**Fuente: Propia**).

## 4. Resultados y discusión.

### 4.1 Definición de un medio no sintético para la producción de un consorcio bacteriano.

La definición de un medio no sintético es un paso esencial para escalar un bioproceso, ya que esto significaría un mejoramiento en la productividad y rentabilidad de este. Las propiedades nutricionales que requieren los microorganismos en general se representan en la **Tabla 1** (fundamento teórico) y comparando estos con las propiedades nutricionales contenida en la melaza en la **Tabla 2** (fundamento teórico), demuestran que la melaza cumple con las propiedades nutricionales adecuadas para ser utilizada como un medio no sintético.

En el proceso de adaptar la melaza como un medio no sintético fue de gran importancia determinar la cantidad de azúcares reductores contenidos en la misma, ya que Arnaldoa (2019) determinó que concentraciones entre el al 6 % de azúcares reductores son ideales para el desarrollo de los microorganismos en el medio, esto permitirá que el proceso no sea inhibido. Donde la concentración de azúcares reductores entre más cerca está al 6% será más ideal.

#### 4.1.2 Azúcares reductores definidos en el medio no sintético.

Después de realizado el método volumétrico por triplicado a una muestra de melaza descrita en la sección de metodología, se obtuvieron las siguientes valoraciones para la misma (**Tabla 4**):

**Tabla 4.** *Tabla de resultados de la determinación de azúcares reductores a la melaza utilizada (Fuente: Propia).*

Valoración	Titulación (mL)	%AR
1	35.2	14.7%
2	34.1	15.1%
3	34.9	14.8%

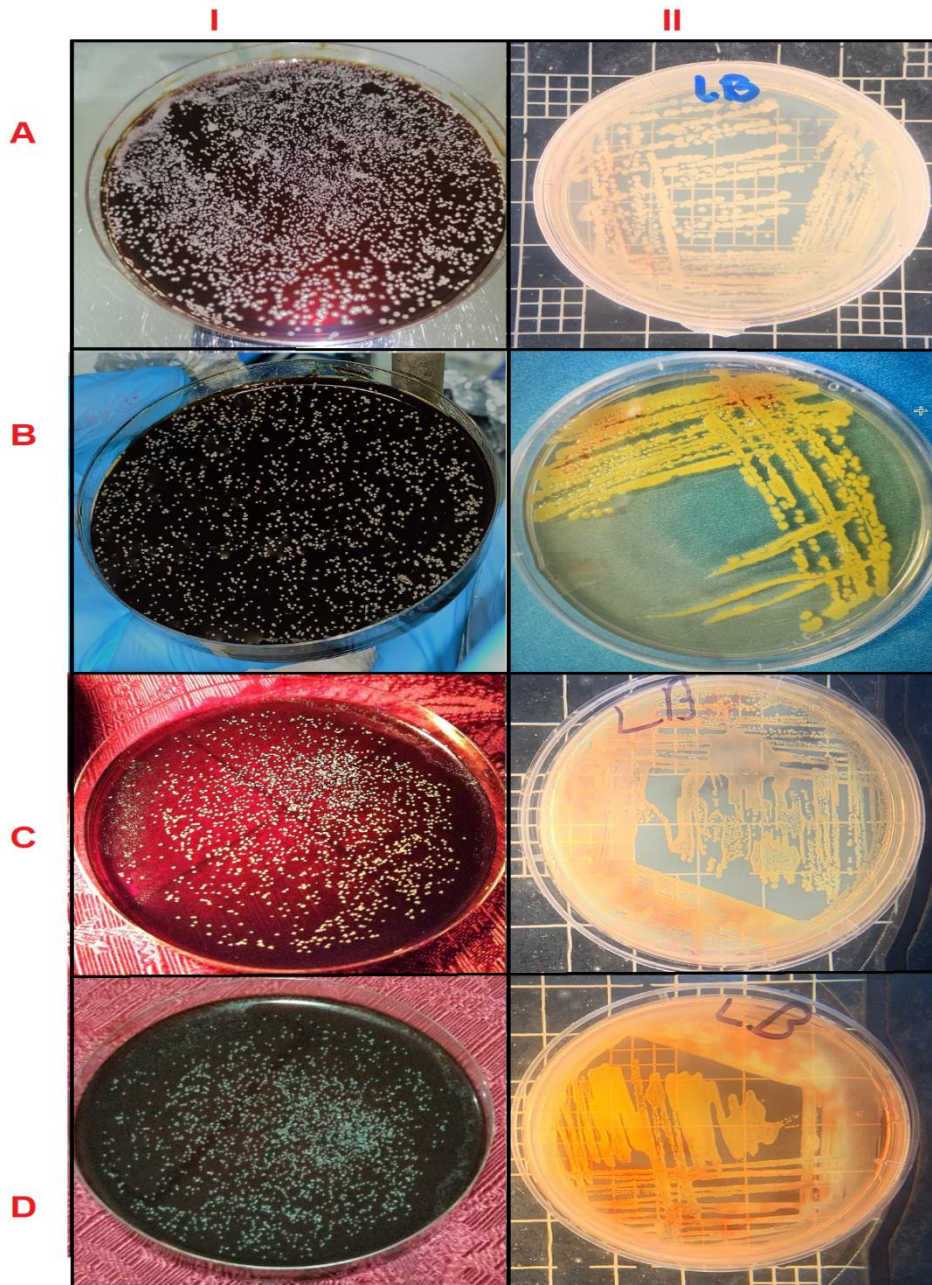
Al obtenerse diferentes valores, se realizó una media aplicando la **ecuación 1**, obteniendo como resultado una valoración general de 34.7 mL. Una vez obtenido el dato de la **ecuación 14**, se sustituyó en la **ecuación 15** y se determinó que en una disolución de melaza al 20%, el porcentaje de azúcares reductores obtuvo una media de 14,9% (**Tabla 1**). Esto indicó una mejora en la melaza del Ingenio Benjamín Zeledón según los análisis de Pashova (1995), a partir del resultado de la **ecuación 15** se llevaron los AR a un 6%, según lo indicado por Arnaldoa (2019) donde define los beneficios de trabajar un medio de cultivo a este porcentaje de AR en la melaza.

#### **4.1.3 Proceso de crecimiento en medio sólido (Placa Petri) del consorcio bacteriano, del medio de cultivo Agar Miller LB a medio de cultivo no sintético Agar-agar y melaza al 6% de azúcares reductores.**

Uno de los objetivos principales de esta investigación es la definición de un medio no sintético a partir de melaza con 6% de azúcares reductores. Mediante la técnica de dispersión por superficie (**Figura 13 de metodología**), se llevó del medio agar Miller LB al medio no sintético de Agar-agar y melaza al 6% de azúcares reductores (**Figura 20**).

Los medios de cultivo en placa Petri de la **Figura 20** (AI, BI, CI, DI), fueron trabajados con melaza al 6% previamente Autoclavado por 15 minutos. Al ser inoculados los microorganismos se dejaron en incubación por un período de 24 horas.

En la **Figura 20**, se muestra el crecimiento y adaptabilidad de cada bacteria después de transferir del medio agar Miller LB al medio Agar-agar y melaza. La bacteria **Bacillus megaterium** presentó mayor adaptación al medio no sintético, la bacteria **Bacillus marisflavi** y **Exiguobacterium aurianticum** también presentaron una buena adaptación siendo su crecimiento muy similar; por lo contrario, la bacteria **Pseudomona mendocina** presentó crecimiento, pero con una velocidad menor.



**Figura 20.** AI (*Bacillus megaterium*) en medio de melaza, AII (*Bacillus megaterium*) en medio LB, BI (*Bacillus marisflavi*) en medio de melaza, BII (*Bacillus marisflavi*) en medio LB, CI (*Exiguobacterium aurianticum*) en medio de melaza, CII (*Exiguobacterium aurianticum*) en medio LB, DI (*Pseudomona mendocina*) en medio de melaza y DII (*Pseudomona mendocina*) en medio LB (Fuente: Propia).

La melaza al 6 % de AR como medio de cultivo no sintético es un medio que favorece al crecimiento bacteriano; adaptar bacterias de un medio sintético a uno no sintético favorece la producción de estas a escalas superiores. En esta investigación se logró adaptar las bacterias a un medio no sintético tal y como se muestra en la **Figura 20**.

#### **4.2 Cinética de crecimiento microbiano.**

Wang & Petra (2019). Describen que el crecimiento celular implica un aumento de su masa y tamaño físico controlado por ambientes físicos, biológicos y químicos. El crecimiento microbiano se cuantifica mediante el aumento de los componentes macromoleculares y químicos de la célula y el patrón de crecimiento de cada microorganismo es único. Madhumathi *et al.*, (2019) indican que la cinética de crecimiento es una reacción auto catalítica que implica que la tasa de crecimiento es directamente proporcional a la concentración de la célula. La concentración celular se mide por métodos directos e indirectos. Los métodos directos incluyen medir la concentración de masa celular, turbidez (densidad óptica), recuento de placas, etc. Mientras que los métodos indirectos para medir la densidad celular se realizan midiendo la concentración de proteínas, ATP o contenido de ADN.

**Condiciones de la cinética microbiana de cada microorganismo contenido en el consorcio bacteriano.:** Guillen & Martínez (2019) realizaron un estudio de la cinética de crecimiento celular de las bacterias que conforman el consorcio, evaluando en medio de cultivo líquido LB, con el objetivo de determinar la duración de la fase Lag o etapa de adaptación y la concentración celular en máxima fase exponencial. Determinaron que ***Bacillus megaterium*** presentó una fase de adaptación que duró aproximadamente 2 horas y alcanzó su punto máximo de crecimiento a las 4.57 horas presentando una absorbancia de 1.7 equivalente a  $1.70E+9$  UFC/mL.

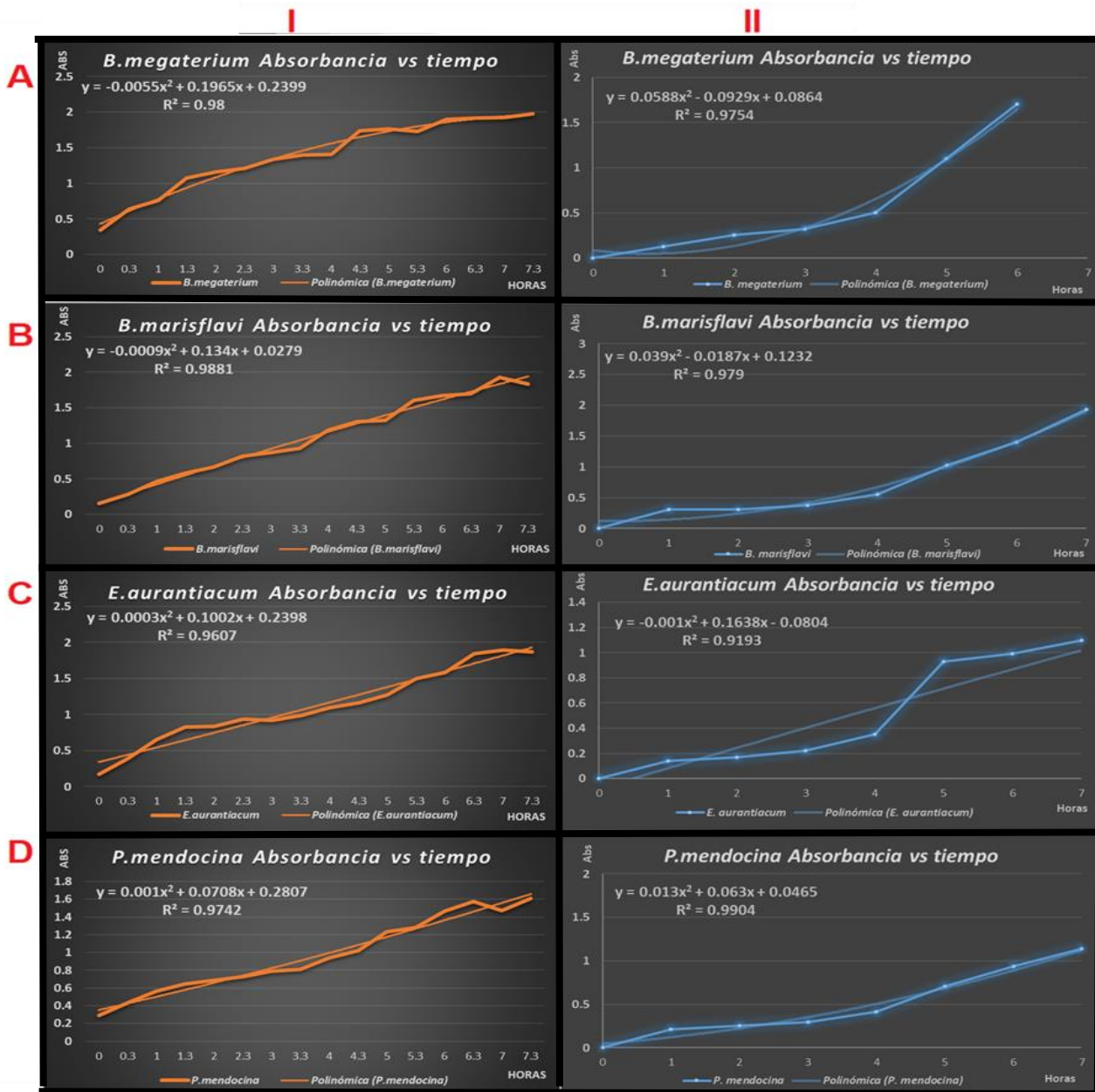
De igual manera observaron que ***Bacillus marisflavi***, presentó una fase de latencia de 37 minutos y su punto de crecimiento máximo fue aproximadamente a las 5 horas presentando una absorbancia de 1.932 equivalente a  $1.93E+9$  UFC/mL;



Asimismo, describieron que la bacteria *Exigobacterium aurantiacum* tuvo una fase de adaptación de 36 minutos y su punto máximo de crecimiento se alcanzó hasta las 6.38 horas presentando una absorbancia de 1.19 equivalente a  $1.19E+9$  UFC/mL. Por último, con la bacteria *Pseudomona mendocina* observaron una fase de adaptación de aproximadamente 1 hora y alcanzó su punto máximo de crecimiento máximo a las 6.36 horas presentado una absorbancia de 1.635 equivalente a  $1.64E+9$  UFC/mL.

El presente trabajo desarrollado utilizando el medio de melaza, se realizó una curva de crecimiento para los cuatro microorganismos, según lo descrito en la metodología, obteniéndose valores de crecimiento (inóculos) después de 16 horas a 170rpm en melaza siendo 2.54Abs para *Bacillus megaterium*, 1.58Abs para *Bacillus marisflavi*, 4.23Abs para *Exigobacterium aurantiacum* y 3.07Abs para *Pseudomona mendocina*. Para la obtención de estos valores se realizaron diluciones seriadas para determinar el valor real de UFC, los resultados (UFC) obtenido en los inóculos únicamente demostraron crecimiento de cada microorganismo.

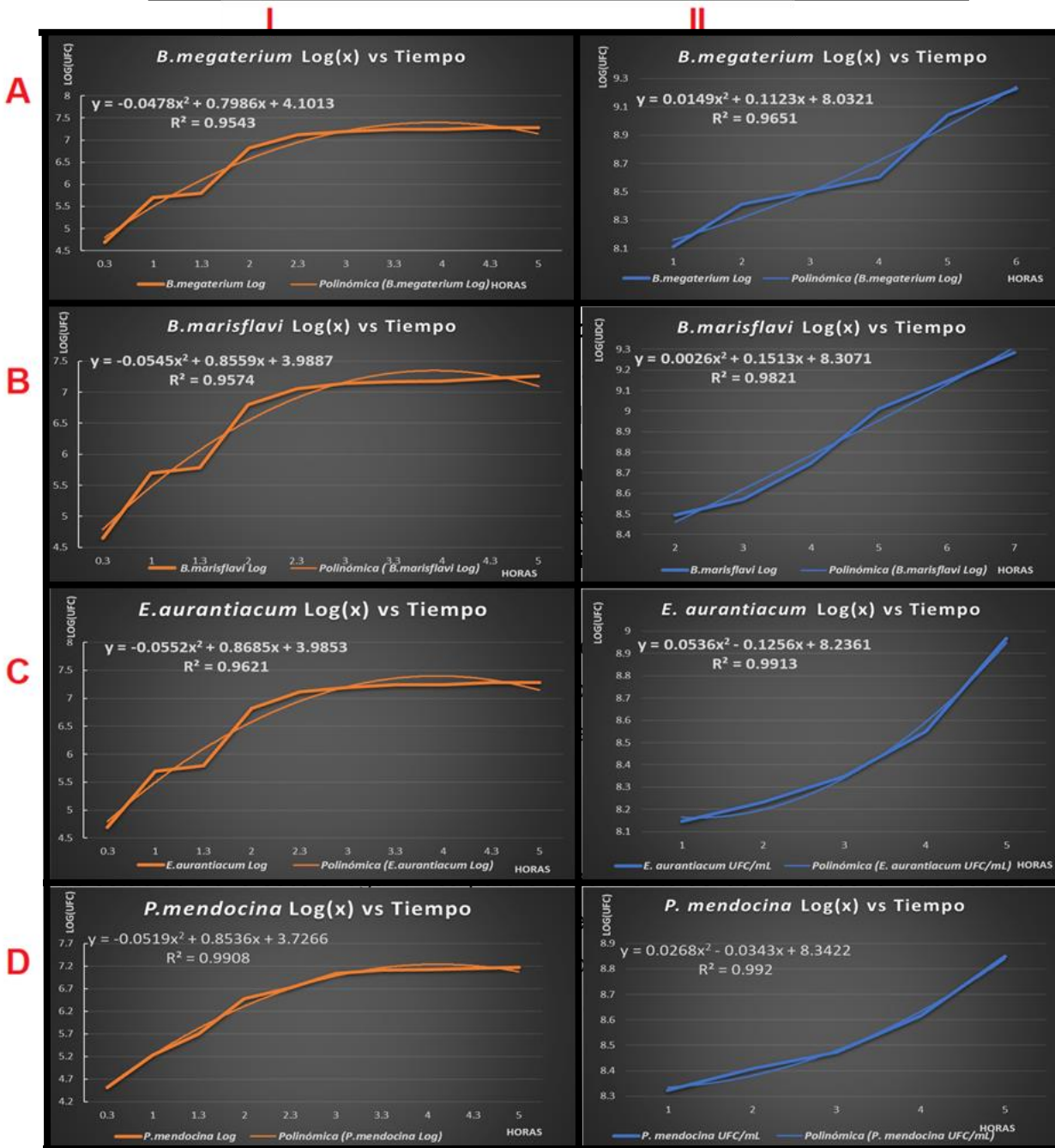
Después de la inoculación, se transfirieron 10 mL de biomasa de este a un Erlenmeyer con un volumen mayor (90 mL) para medir constantemente el crecimiento microbiano. Posteriormente se determinaron las condiciones de crecimiento de los microorganismos mediante la lectura de absorbancia a 650nm por medio de diluciones seriadas a la -1, esto debido a que la composición del medio dificultaba la lectura a una longitud de onda menor. Esta medición se realizó cada 30 minutos. Una vez realizado el análisis se obtuvieron los siguientes resultados del crecimiento de cada microorganismo (**Figura 21**) y se comparó con los resultados de Guillén y Martínez (2019).



**Figura 21.** Curva de absorbancia, AI (*Bacillus megaterium*) en melaza, AII (*Bacillus megaterium*) en medio LB, BI (*Bacillus marisflavi*) melaza, BII (*Bacillus marisflavi*) en medio LB, CI (*Exiguobacterium aurianticum*) en melaza, CII (*Exiguobacterium aurianticum*) en medio LB, DI (*Pseudomona mendocina*) en medio de melaza y DII (*Pseudomona mendocina*) en medio LB. (Fuente: Tomado y adaptado de Guillén y Martínez, 2019).

Una vez construidas las curvas cinéticas correspondientes a las 4 bacterias, se observó que la bacteria ***Pseudomona mendocina*** (**Figura 21 DI**) su fase de adaptación duró aproximadamente 30 minutos y alcanzó su punto máximo de crecimiento a las 7 horas con 30 minutos, presentando una absorbancia de 1.61Abs. Guillén y Martínez (2019) reportaron que, para ***Pseudomona mendocina*** (**Figura 21 DII**) la fase de adaptación duró aproximadamente 1 hora y alcanzó su punto máximo de crecimiento a las 6 horas con 36 minutos, presentando una absorbancia de 1.635Abs. En cuanto a la bacteria ***Bacillus megaterium*** (**Figura 21 AI**), su fase de adaptación duró aproximadamente 30 minutos, su punto máximo de crecimiento a las 7 horas con 30 minutos, presentando una absorbancia de 1.98Abs. En Guillén y Martínez (2019), describieron que ***Bacillus megaterium*** (**Figura 21 AII**) presentó una fase de adaptación que duró aproximadamente 2 horas y alcanzó su punto máximo de crecimiento a las 4 horas con 57 minutos, presentando una absorbancia de 1.7Abs. Asimismo, la bacteria ***Bacillus marisflavi*** (**Figura 21 BI**), presentó una fase de adaptación con duración de 30 minutos, un punto máximo de crecimiento a las 7 horas, con una absorbancia de 1.93Abs. Según Guillén y Martínez (2019) observaron que ***Bacillus marisflavi*** (**Figura 20 BII**), presentó una fase de latencia de 37 minutos y su punto de crecimiento máximo fue aproximadamente a las 5 horas, presentando una absorbancia de 1.932Abs. Por último, ***Exiguobacterium aurantiacum*** (**Figura 21 CI**) presentó una fase de adaptación con un tiempo de duración de 30 minutos, alcanzando un punto máximo de crecimiento a las 7 horas, con una absorbancia de 1.90Abs.; Guillén y Martínez (2019) observaron que la bacteria ***Exigoubacterium aurantiacum*** (**Figura 21 CII**) tuvo una fase de adaptación de 36 minutos y su punto máximo de crecimiento se alcanzó hasta las 6 horas con 38 minutos, presentando una absorbancia de 1.19Abs.

En el gráfico se puede mostrar que, basándose en el índice de regresión de la **Figura 21**, se compara la confiabilidad de ambos modelos determinando que el crecimiento bacteriano en el medio no sintético es más fiel a este índice obteniendo valores por encima de 0.95, esto por las características y adaptabilidad de los microorganismos en la melaza al 6% de azúcares reductores, las propiedades de la melaza definidas en fundamento teórico indican como estas favorecen el crecimiento de los microorganismos, permitiendo a las bacterias ***Bacillus megaterium***, ***Bacillus***



**Figura 22.** Curva de crecimiento de UFC en escala logarítmica: A-I (*Bacillus megaterium*) en melaza, A-II (*Bacillus megaterium*) en medio LB, B-I (*Bacillus marisflavi*) en melaza, B-II (*Bacillus marisflavi*) en medio LB, C-I (*Exiguobacterium aurianticum*) en melaza, C-II (*Exiguobacterium aurianticum*) en medio LB, D-I (*Pseudomona mendocina*) en medio de melaza y D-II (*Pseudomona mendocina*) en medio LB (Fuente: Tomado y adaptado de Guillén y Martínez, 2019).

Relacionando **Anexo 3** y la **Figura 22** anterior se determinó que, ***Pseudomona mendocina*** presentó una fase de adaptación de 0.30 horas equivalente a  $3.30E+04$ UFC. Su mayor concentración de crecimiento se obtuvo a las 7.30 horas con  $1.73E+07$ UFC. Según Guillen y Martínez (2019), para ***P. mendocina***, su fase de adaptación de 1 hora equivalente a  $2.10E+08$ UFC y mayor concentración de crecimiento a las 9 horas equivalente a  $1.64E+09$ UFC. Asimismo, ***Bacillus megaterium*** presentó una fase de adaptación de 0.30 horas en equivalente a  $5.50E+04$ UFC. Su mayor concentración de crecimiento se obtuvo a las 7.30 horas con  $2.80E+07$ . En el trabajo Guillen y Martínez (2019), ***B. megaterium*** presentó fase de adaptación 1 hora equivalente a  $2.57E+08$ UFC, y mayor concentración de crecimiento a las 6 horas  $1.70E+09$ UFC. Por su parte, ***Bacillus marisflavi*** presentó una fase de adaptación de 0.30 horas equivalente a  $4.50E+04$ UFC. Su mayor concentración de crecimiento se obtuvo después de las 7 horas con  $1.95E+07$ UFC. En Guillén y Martínez (2019), en cuanto a ***B. marisflavi***, su fase de adaptación fue de más de una hora equivalente a  $3.07E+08$ UFC y su mayor concentración de crecimiento a las 7 horas con  $1.93E+09$ UFC. Por último, ***Exigobacterium aurantiacum*** presentó una fase de adaptación de 0.30 horas equivalente  $4.95E+04$ UFC. Su mayor concentración de crecimiento se obtuvo entre las 7 horas y 7.30 horas  $2.25E+07$ UFC. En cuanto a Guillén y Martínez (2019), ***E. aurantiacum***. Tuvo una fase de adaptación 1 hora  $1.40E+08$ UFC. La mayor concentración de crecimiento fue a las 8 horas con  $1.19E+09$ UFC.

De los gráficos obtenidos del crecimiento en placa con Agar-agar y melaza, se comparó con el crecimiento teórico obtenido de la referencia de Guillén y Martínez (2019) por el método de McFarland. Basándose en el índice de regresión; también en este caso podemos determinar que el crecimiento en placa de agar-melaza obtenido fue de mayor confiabilidad, obteniéndose valores superiores a 0.94. Cabe destacar que a esto se le atribuye que los resultados obtenidos mediante el recuento en placas son mucho más acertados que el método de McFarland ya que el primero si es un procedimiento práctico.

La investigación de Sarrau (*et al.*, 2012) determinó en bacterias del género ***Bacillus*** por medio de crecimiento en placas Petri en agar LB, fases de adaptación de hasta 1 hora con un promedio de  $4.50E+04$ UFC, donde su mayor concentración de crecimiento fue a las 16 horas con  $6.36E+08$ UFC, en la bacteria ***P. mendocina*** Pisani (*et al.*, 2007) registró

crecimiento en placa Petri en el medio de cultivo Agar-cetrimide fases de adaptación de 0.30 horas donde obtuvo  $.7.59E+04$ UFC su mayor concentración se alcanzó a las 18 horas con valores de  $9.27E+08$ UFC.

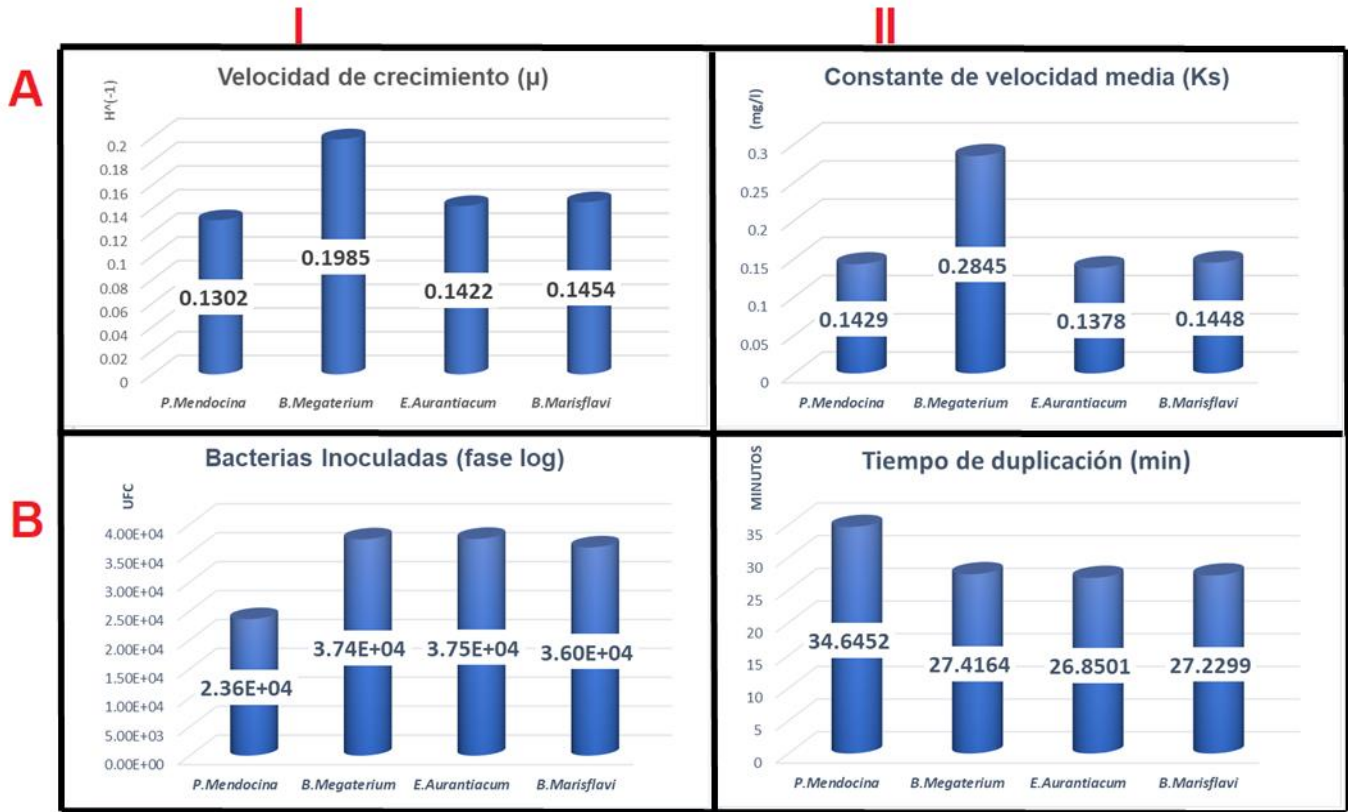
A partir los datos obtenidos del crecimiento de los microorganismos y las bibliografías consultadas , se logró determinar que en este medio no sintético se obtuvieron mejores rendimientos y se puede decir que los factores que favorecen un mejor crecimiento en dicho medio no sintético, fueron la adaptación del consorcio bacteriano a partir de medio LB a Agar-Agar y melaza previo a la fermentación lo que implica que el metabolismo bacteriano se adapte a este medio ya que si pasamos directamente del medio LB al Erlenmeyer con melaza, habría poco tiempo de adaptación y el microorganismo presentaría poco crecimiento en la lectura de absorbancia. Entonces, al realizar la adaptación al medio sólido con melaza, las bacterias presentan un mejor crecimiento en su posterior inoculación nuevamente en agar o caldo melaza. Cabe destacar que a medida que se fue realizando cada fermentación, los rendimientos fueron aumentando, lo que significa que, si se continuase realizando la fermentación en este medio, se pueden obtener valores aún más altos, incluso también si se le brindara más tiempo para la fermentación, ya que los resultados de *Sarrau, et al., (2012)* y *Pisani, et al., (2007)* reportaron los mayores crecimientos a las 16 y 18 horas.

#### **4.3 Diseño tecnológico de un prototipo de biorreactor para la producción de un Biofertilizante.**

En el proceso de escalamiento es necesario conocer del microorganismo en cuestión, los parámetros cinéticos, o sea, el comportamiento de la generación de colonias, tasa de crecimiento, tiempo de generación de colonias y las velocidades de crecimiento.

**Resultados de los parámetros cinéticos calculados del consorcio bacteriano a nivel experimental:** Estos parámetros fueron calculados mediante las fórmulas propuestas en la metodología: Tasa máxima de crecimiento (**Fórmula 1, Fundamento Teórico**), Velocidad de crecimiento " $\mu$ " (**Fórmula 2, Fundamento Teórico**), Generación de colonias y tiempo de generación (**Fórmula 3, Fundamento Teórico**), Constante de velocidad " $K_s$ " (**Fórmula 16, Metodología**). Estas fórmulas fueron ejecutadas en la fase

Log determinada de cada microorganismo ya que este es el momento en que las bacterias tienen un crecimiento acelerado y su actividad metabólica es muy alta (Combase, 2018), por tales razones la fase log es la de mayor interés para la producción del biofertilizante.



**Figura 23.** Parámetros cinéticos, A-I Velocidad de crecimiento, A-II Constante de velocidad, B-I Bacterias Inoculadas y B-II Tiempo de duplicación (Fuente: Propia).

Analizando el **anexo 4** y la **Figura 23**, se determinó que, ***Pseudomonas mendocina*** presentó una velocidad promedio de crecimiento (**Figura 23 A-I**) de  $0.13024 \text{ (h}^{-1}\text{)}$ , esto permitió determinar la velocidad de crecimiento de cada fase de la cinética del microorganismo (**Anexo 4**), en el trabajo de Valencia (2018) se determinó una velocidad promedio de crecimiento en melaza para ***P. mendocina*** de  $0,1032 \text{ (h}^{-1}\text{)}$ , al ser casi similares los resultados de velocidad de crecimiento, por ende, la constante de velocidad media “Ks” lo será también, ***P. mendocina*** (**Figura 23 A-II**) obtuvo una Ks de  $0.1420 \text{ mg/L}$ , esto indica la concentración del sustrato limitante para el crecimiento

cuando  $\mu/\mu_{max} = 0.5$  (**Anexo 4**), este resultado se ve involucrado en el tiempo de duplicación de esta bacteria, la cual se estará duplicando cada 34 minutos (**Figura 23 B-II**); Valencia (2018) obtuvo un tiempo de duplicación de 29 minutos con la diferencia de mantener una alimentación semidiscontinua del sustrato, lo que le permitió reducir este tiempo. Sin embargo, la cantidad de bacteria inoculadas de *P. mendocina* (**Figura 23 B-I**) obtuvo un valor de  $2.36E+04$ , donde Valencia (2018) obtuvo un valor de  $5.49E+03$ . Estos resultados determinan que el pre-tratamiento y tratamiento de la melaza propuesto en la metodología presenta mejor rendimiento y un medio más idóneo para el microorganismo.

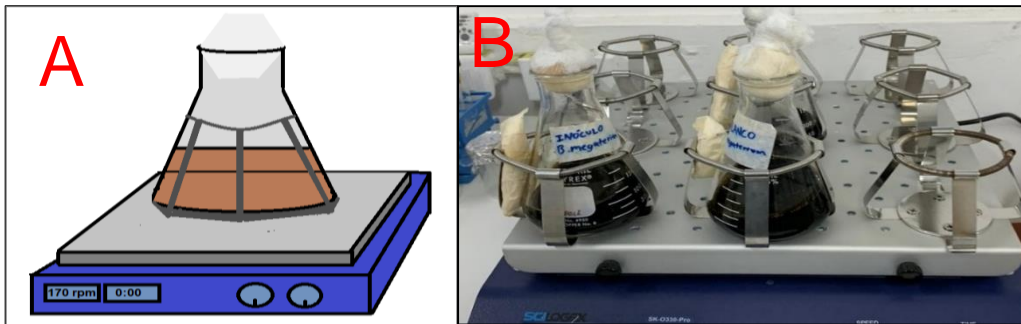
La bacteria *Bacillus megaterium* presentó una velocidad promedio de crecimiento (**Anexo 4**) de  $0.1985 (h^{-1})$  (**Figura 23 A-I**) y la bacteria *Bacillus marisflavi* de  $0.1454 (h^{-1})$ , las pruebas de Portillo (2009) en bacterias del género *Bacillus* reportaron una velocidad promedio  $0.2385 (h^{-1})$ , estas fueron realizadas con las mismas condiciones explicadas en la metodología, con la diferencia que el medio de inoculación utilizado por Portillo (2009) fue Caldo M.R.S. *Bacillus megaterium* obtuvo una  $K_s$  de  $0.2845 \text{ mg/L}$  esta misma se estará duplicando cada 27.41 minutos, *Bacillus marisflavi* obtuvo una  $K_s$  de  $0.1448 \text{ mg/L}$  (**Figura 23 A-II**) y se estará duplicando cada 27.22 minutos (**Figura 23 B-II**), Portillo (2009) reportó su tiempo de duplicación para bacterias del género *Bacillus* cada 24 minutos. La diferencia en el tiempo de duplicación no es significativa considerando que el caldo M.R.S, es un caldo específico para el crecimiento de *Bacillus*.

La bacteria *Exigobacterium aurantiacum* obtuvo una velocidad promedio de crecimiento (**Anexo 4**) de  $0.1422 (h^{-1})$  (**Figura 23 A-I**), se determinó una  $K_s$  de  $0.1378 \text{ mg/L}$  (**Figura 23 A-II**) con un tiempo de duplicación (**Figura 23 B-II**) 26.85 minutos, esta bacteria presentó comportamiento similar a las bacterias *Bacillus marisflavi* y *Pseudomona mendocina*, sus velocidades promedio de crecimiento no presentaron diferencia significativa, mismo caso para el tiempo de duplicación y  $K_s$  por lo tanto estas bacterias presentan las condiciones de poder ser reproducidas en un mismo biorreactor según las características y similitud en los parámetros cinéticos, a diferencia *Bacillus megaterium* obtuvo rangos superiores donde la velocidad de crecimiento es mayor lo que significa que su consumo de sustrato es mayor por lo cual debe de reproducirse de forma independiente.



### 4.3.1 Resultados y condiciones del modelo experimental a nivel de laboratorio (Erlenmeyer) para la obtención del Biofertilizante.

Los análisis y resultados obtenidos a nivel de laboratorio de cada bacteria estudiada son la base del experimento realizado en el volumen 250 mL. El modelo es conformado por un Erlenmeyer con capacidad de 250 mL de volumen máximo y espectrofotómetro UNICO UV-2100, en la **Figura 24** se representa el modelo experimental.



**Figura 24.** (A. Modelo del experimento a nivel de laboratorio.) (B. experimento a nivel de laboratorio.) (Fuente: Propia).

Del modelo se obtienen los siguientes datos usados en pruebas de laboratorio. Ver a continuación la **Tabla 5**.

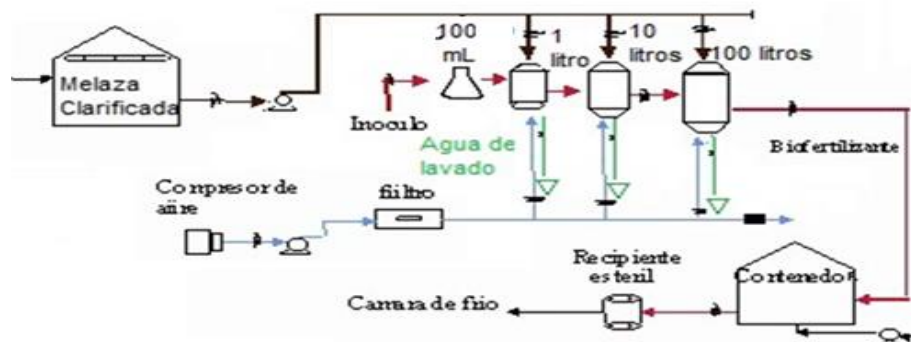
**Tabla 5.** Datos del equipo del experimento (Erlenmeyer) a escala laboratorio (Fuente: Propia).

Volumen total ( $V_t$ )	250 mL
Volumen efectivo ( $v$ )	100 mL
Diámetro del Mezclador ( $D_r$ )	78 mm
Velocidad de agitación ( $N$ )	170rpm
Altura total ( $H$ )	129 mm.
Altura de llenado ( $h$ )	51.6 mm
Temperatura del sistema de mezclado ( $T_r$ )	26 °C
Temperatura del medio de intercambio ( $T_m$ )	24+/- °C
Potencia del agitador	0,04 X10 <sup>-3</sup> W

Los datos de la **Tabla 5** son el punto de partida del escalado, donde se pudo determinar un volumen efectivo de 100 mL; siguiendo los criterios de Doran (1999) el volumen efectivo debe ir en aumento de 10 veces esta misma cantidad, quedando el escalamiento a los siguientes volúmenes: 1 litro; 10 litros y 100 litros.

Una vez determinado los volúmenes efectivos para el escalado, se elaboró un flujograma (**Figura 25**) de lo que debe ser el bioproceso, tomando en cuenta los parámetros obtenidos a 100 mL donde por similitud geométrica y técnica de escalamiento de un proceso continuo se llevó de 100 mL a 100 litros de volúmenes.

**Diseño tecnológico prototipo del escalamiento de un Biofertilizante:** El modo de operación escogido fue de un biorreactor continuo debido a las ventajas que ofrece (**Figura 25**), entre las que se pueden destacar: su fácil manejo, construcción y la minimización de los riesgos de contaminación por microorganismos externos Doran (1999). Como se puede apreciar en el modelo inicial (**Anexo 4**) las  $K_s$  de los microorganismos son apreciables con respecto a la concentración de sustrato inicial.



**Figura 25.** Diagrama de flujo del Bioproceso partiendo de 1 litro hasta 100 litros para la producción del Biofertilizante (Fuente: Tomado y adaptado de Gaitán y García, 1998).

La **Tabla 5** y el diseño propuesto por Lavín (2018) complementado de las fórmulas derivadas de la ecuación de Monod y criterios de escalado propuesto en la metodología, permitió elaborar los diseños tecnológicos de Biorreactores prototipo y ajustable, donde se debe mantener semejanza geométrica entre el modelo y el prototipo de escalamiento. Ver a continuación **Tabla 6**, donde se muestran los datos del diseño tecnológico de cada dimensión propuesta de los biorreactores prototipos para volúmenes efectivos de 1, 10 y 100 litros

siguiendo los criterios de Doran (1999) y el algoritmo tecnológico propuesto en la metodología.

**Tabla 6.** Resultados prototipo del diseño tecnológico para cada volumen propuesto (Fuente propia).

<b>Volumen total (Vt)</b>	1.5 L	15 L	150 L
<b>Volumen efectivo (v)</b>	1 L	10 L	100 L
<b>Diámetro del Mezclador (Dr)</b>	117 mm	222 mm	444 mm
<b>Velocidad de agitación (N)</b>	170rpm	169rpm	168 rpm
<b>Altura total (H)</b>	210 mm	350 mm	917.1 mm
<b>Altura de llenado (h)</b>	147mm	245 mm	642 mm
<b>Temperatura del sistema (Tr)</b>	30 °C	30 °C	31 °C
<b>Temperatura del medio (Tm)</b>	30+/- °C	30+/- °C	30+/- °C
<b>Potencia del agitador (Np)</b>	0,04 X10 <sup>-2</sup> W	1.101 W	11,01 W
<b>Diámetro del impulsor (Di)</b>	38.961 mm	73.926 mm	147.85 mm
<b>Ancho de la paleta (Ap)</b>	7.79 mm	14.78 mm	29.57 mm
<b>Longitud de Paleta (Li)</b>	9.74 mm	18.48 mm	36.96 mm
<b>Distancia del Impulsor (Hi)</b>	38.961 mm	73.926 mm	147.85 mm
<b>Número de baffles. (Nb)</b>	4 U	4 U	4 U

Los diseños prototipos de cada Biorreactor son modelos ajustables donde los parámetros calculados deben mantener semejanza geométrica desde el laboratorio (**Tabla 6**) hasta la planta piloto. Con los resultados obtenidos del modelo experimental a nivel laboratorio se ajustaron los parámetros propuestos en la metodología, obteniendo así un modelo ajustable que permita la ejecución a escala inferiores o superiores.

Para lograr que no exista muerte celular por agitación excesiva, es necesario calcular la velocidad de agitación para el biorreactor modelo. Teniendo en cuenta la **ecuación (10)** (fundamento teórico) la velocidad de agitación calculada fue de 170 r.p.m. con número de potencia de 2,01 W según **Figura 4** (fundamento teórico), pero como el biorreactor modelo no cumple con las relaciones de magnitudes estándares para agitadores, por lo que el Np de trabajo se obtiene mediante la **fórmula 16** (fundamento teórico). ver (**Tabla 5**)

Al realizar el escalado se consideraron los diferentes factores para trasladarse de una escala a otra como: los requerimientos del bioproceso, las características e impacto del diseño del proceso, la geometría del reactor y selección del agitador, la selección y diseño de los accesorios; algo que a lo largo del trabajo se demostró la importancia de considerar cada factor mencionado, además de que también a través del escalado también se debe considerar la optimización de los costos de producción, siendo este encaminado a evitar gastos más allá de los necesarios logrando un mayor beneficio en la producción a gran escala.

El balance de calor en las escalas propuesta es despreciable ya que Levin (2018) determina que desde el laboratorio a la planta piloto el calor no será un factor apreciable cuando los límites son menores a 500 L, por lo tanto, este debe ser considerado como una variable cuando el sistema tenga volúmenes mayores.

El estudio de Delgado & Ruiz (2020) determina que el comportamiento de un biorreactor de 15 a 150 litros de volumen efectivo mantiene similitud geométrica por lo cual la tendencia de  $K_La$  debe de mantener valores similares. Levin (2018) de igual manera determina que esta similitud debe mantenerse en el modelo tecnológico. Por ende, los resultados obtenidos en el modelo experimental permitieron realizar unos modelos prototipos, los cuales se desarrollaron mediante el diseño de un algoritmo tecnológico que se pueda ajustar a valores reales, el trabajo de Ramírez & López (2020) indica que este algoritmo debe de ser adaptable y preciso para escalas inferiores y superiores. Por lo cual los resultados a nivel de laboratorio permitieron que el modelo propuesto se pueda llevar a volúmenes de 1, 10 y 100 litros siguiendo el algoritmo propuesto en la metodología.

## Capítulo 5. Conclusiones

La realización del presente trabajo y el análisis de los resultados alcanzados, permitieron plantear las siguientes conclusiones considerando los objetivos que se establecieron al inicio de este:

1. Los resultados obtenidos determinaron que partiendo de una muestra de disolución de melaza del ingenio Benjamín Zeledón al 20%, el porcentaje de azúcares reductores fue 14.9% que posteriormente se llevó a un 6% como indicaba la referencia, dando como resultado un medio no sintético que favorece el crecimiento de los microorganismos aun comparándose con un medio sintético comercial como el medio LB.
2. Las condiciones en la que se trabajó la cinética de crecimiento microbiano garantizaron lo demostrado en el medio sólido de melaza, donde se determinaron los resultados de las concentraciones celulares, favoreciendo al crecimiento en medio no sintético en comparación a la de la referencia en caldo LB donde *B. megaterium* en melaza alcanzó su mayor concentración de crecimiento a las 7.30 horas presentando una absorbancia de 1.98 equivalente a  $2.80E+7$  UFC/mL, y en caldo LB tuvo su mayor concentración a las 4.57 horas presentando una absorbancia de 1.7Abs y su crecimiento máximo fue de  $1.70E+09$  UFC/mL. *B. marisflavi* en melaza tuvo su concentración celular más alta aproximadamente a las 7.30 horas presentando una absorbancia de 1.93 equivalente a  $1.95E+7$  UFC/mL y en comparación con la referencia, estas obtuvieron su concentración máxima de crecimiento a las 5 horas siendo 1.932 su absorbancia y su mayor crecimiento fue a las 7 horas obteniendo  $1.93E+09$  UFC/mL. La mayor concentración de crecimiento de *Exigobacterium aurantiacum* en melaza se alcanzó hasta las 7 horas presentando una absorbancia de 1.90 equivalente a  $2.25E+7$  UFC/mL y en caldo LB fue a las 6.38 horas equivalente a 1.19Abs y en cuanto a UFC fue a las 8 horas con  $1.19E+09$ . *Pseudomona mendocina* alcanzó su mayor concentración celular a las 7.30 horas presentado una absorbancia de 1.61 equivalente a  $1.73E+7$  UFC/mL y del trabajo citado en la comparación,

para esta bacteria su concentración más alta fue a las 1.635Abs y su crecimiento máximo a las 9 horas equivalente a 1.64E+09UFC. Además de obtener mejores valores y como se señaló anteriormente, la comparación en cuanto al crecimiento en UFC realizado en el medio de melaza fue por conteo en placa Petri, mientras que en el medio LB fue por el método teórico de McFarland lo que les da mayor confiabilidad a los resultados obtenidos en la melaza, siendo el conteo en placa un método práctico cuantitativo con resultados más exacto en cuanto a la determinación de crecimiento celular.

3. Los parámetros cinéticos de cada microorganismo determinaron: la velocidad de crecimiento, la constante de saturación ( $K_s$ ) y el tiempo de duplicación de las bacterias. ***Bacillus. Marisflavi***, presento su velocidad de crecimiento de  $0.1454 \text{ (h}^{-1}\text{)}$  duplicándose cada 27.22 minutos con una  $K_s$  de 0.1448 mg/L, ***Bacillus megaterium*** obtuvo una velocidad de crecimiento de  $0.1985 \text{ (h}^{-1}\text{)}$  su tiempo de duplicación se estableció en cada 27.41 minutos para dar un valor de  $K_s$  en 0.2845 mg/L, ***Exigobacterium aurantiacum*** presento su velocidad de crecimiento de  $0.1422 \text{ (h}^{-1}\text{)}$  duplicándose cada 26.85 minutos con una  $K_s$  de 0.1378 mg/L, ***Pseudomonas mendocina*** obtuvo una velocidad de crecimiento de  $0.13024 \text{ (h}^{-1}\text{)}$  su tiempo de duplicación se estableció en cada 34 minutos para dar un valor de  $K_s$  en de 0.1420 mg/L, siendo esta última la bacteria con menor velocidad de crecimiento, menor constante de saturación y mayor tiempo de duplicación, las demás bacterias demostraron gran similitud en sus parámetros. Mediante estos resultados del modelo experimental los datos obtenidos fueron la base para diseñar modelos tecnológicos ajustables para el escalamiento de la producción de un biofertilizante.
4. Se lograron diseñar tres prototipos ajustables para la producción del biofertilizante, estos se determinaron mediante similitud geométrica, partiendo de la base del modelo experimental de 100 mL de volumen útil, se establecieron los prototipos para la producción de: 1, 10 y 100 litros de volumen útil para el Biofertilizante. Se sintetizó un algoritmo para el diseño

tecnológico de los reactores prototipo, lo cual deberá unirse al diseño mecánico para su construcción final.

## Capítulo 6. Recomendaciones

1. Es necesario evaluar el crecimiento de las bacterias *Bacillus marisflavi*, *Exigobacterium aurantiacum*, *Bacillus megaterium* y *Pseudomonas mendocina* por periodos mayores de tiempo a los realizados en este trabajo, para determinar sus puntos exponenciales máximos y evaluar la probabilidad de tener mayor porcentaje de biomasa y mayor conteo en placa, esto para un mejor ajuste en los valores de parámetros cinéticos.
2. Aumentar la capacidad de producción del Biofertilizante, utilizando los modelos aquí propuestos para el ajuste de nuevos parámetros tecnológicos que permitan el escalado del proceso a niveles superiores.
3. Incluir en estudios posteriores, el análisis de la rentabilidad del bioproceso, lo cual no ha sido objetivo del presente trabajo.

## Capítulo 7. Bibliografías

- American Society for Microbiology (ASM) (2015). *Características de los microorganismos*, Revista ASM, 45–49.
- Asociación Española de Fabricante de Agronutrientes (AEFA) (2017), *Glosario de terminos utiles en agronutrición de biofertilizantes*, Revista de Valencia , 7,14-19.
- Aiba, S., & Humprey, A. (1964). *Biochemical Engineering*, Editorial John Wiley & Sons, Nueva Jersey, Estados Unidos.
- Anaya,D., Alejandro; Pedroza,F., Humberto. (2008). *Escalamiento, el arte de la ingeniería química: Plantas piloto, el paso entre el huevo y la gallina*, Red Científica, 2, 31-39.
- Arnaldoa,J., (2019). *Influencia de la concentración de Azúcares Reductores Totales "ART" de "brácteas" de Cynara scolymus L. var.lorca (Asteraceae) "alcachofa" en la producción de biomasa de Candida utilis*, Trabajo final para optar a la maestría en Biotecnología ambiental. Universidad de Puerto Rico, Trujillo .
- Bioestimulantes agrícolas (Biagro). (2020). *Vademecum de productos fitosanitarios y nutricionales*, Revista Biagro,10-18.
- Bharat Integrated Social Welfare Agency (BISWA) (2014). *Bioreactors–Technology & Design Analysis*, Revista “The Scitech Journal” , 28–36.
- Blanco., G. M. (1994). *Producción de un medio de cultivo a Bases de producto agroindustriales*, Revista Mexicana de ciencia agrícolas, 125-130.



- Boci.,J. (21 de abril de 2020). Características de Medios de Cultivos, *Revista IngeTecno*, 140-143.
- Brock, T., Madigan, T., Martinko.,& Parker.,J. (1994). *Biology of microorganisms*, *Revista Pretince Hall*, 20-50.
- Carlsson, J. (2015). "Optimal steady-state design of zone volumes of bioreactors with Monod growth kinetics". *Biochemical Engineering Journal*, 100, 59-66.
- Centro Europeo de Postgrado (CEUPE) (2019). *Desarrollo Micorbiano en medios de cultivos alternativos* . *Revista de Barcelona*, 55-56.
- Chávez, A. (2017). *Optimización de la producción del agente de biocontrol Candida sake (CPA-1)*. *Revista de a Universite lleida*, 28, 140-150.
- Chezeau, B., & Vial, C. (2019). *Modeling and Simulation of the Biohydrogen Production Processes*, *Revista ALTEC*, 150, 175.
- Collado, S. (2016). *Diseño y escalado de un bioproceso*, *Revista de Oviedo*, 5, 12-19.
- Combase. (2018). *Crecimiento Bacteriano* (Cursos de la Universidad de la Salamanca), Recuperado de: <https://cutt.ly/On9vhrY>.
- Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) (2015). *Crecimientos y nutrición de plantas mediante la aplicación de Microorganismo*, *Revista CONACYT*, vol 124, 30-45.

- Condorís, M. (2014). *Deterioro y conservación de los alimentos*, Tesis de grado para optar al título de Ingeniero Industrial de alimentos, Universidad Nacional de San Agustín, Arequipa, Perú.
- Delgado, H., & Ruiz, O. (2020). *Escalado de la producción de Bacillus Thuringensis (Bt)*, Trabajo de fin de curso de la clase de Fundamentos de los Bioprocesos, Universidad Politécnica de Nicaragua, Managua, Nicaragua.
- Díaz, M. (2012). *Ingeniería De los Bioprocesos. Editorial: Paraninfo*, 8, 120-140
- Dorán, P. (1999). *Fluid Flow and Mixing, Bioprocess Engineering Principles, Editorial Acribia S.A*, 1, 139-150.
- Durango, L. (2007). *Evaluación y escalamiento de la producción de levaduras nativas tipo Saccharomyces spp, a nivel de laboratorio*, Tesis de grado para optar al título de Ingeniero químico, Universidad colombiana EAFIT). Repositorio Institucional, 55-134.
- Ertola, R., Yantorno, O., & Mignone, C. (1994). *Microbiología Industrial, Editorial Acribia S.A*, 7, 123-180, ISBN 978-987-95081-0-7.
- Fernandez, G. (2012). *Principios de la Fisicoquímica para procesos Biotecnológicos, Editorial Cengage, vol 2*, 400-430.
- Gaitán, A.; García, E. (Junio de 1998). *Prueba a nivel de campo y escalado a planta piloto del proceso de producción de biofertilizante*, Tesis de grado para optar al título de Ingeniería Química, Universidad Nacional de Ingeniería, Managua, Nicaragua.

- Gallegos,C. (10 de abril de 2014). *Biofertilizantes microbianos. Biofertilizantes microbianos*, Editorial Plaza y Valdéz S. A, 23-39.
- Garcia, C. (2019). *Diseño tecnológicos para Bioreactores*, *Revista Universitaria de Chile*, vol 12,9-18.
- Garro., D. O. (2019). *Biotecnología y Biología Molecular*, *Revista Posadas de Argentina*, vol 24,12-15.
- Guerrero, R. (23 de Diciembre de 2015). *Agricultura en el PIB*, *El Nuevo Diario*, pág 4, Managua, Nicaragua.
- Guial,L. (16 de Junio 2020).Manejo de Biofertilizantes mediante consorcios Bacterianos, *The Internet Journal of Microbiology*, vol. 7(1), 1-8.
- Guillén Rodriguez, L. S., & Martínez Laguna, G. I. (2019). *Desarrollo del proceso de producción a escala de laboratorio, para el crecimiento de un consorcio microbiano con propiedades biofertilizantes aislados de bioinsumos artesanales*. Trabajo para optar al título de Ingeniería Química , Universidad Nacional de Ingeniería, Managua, Nicaragua.
- Hernandez, A. (2003). *Importancia de la Microbiología Industrial*, Editorial EUNED de Costa Rica,45,22-25.
- Hernández, D., & Loaiza, A. (2014). *Selección de un método para la conservación y preservación de actinomicetos aislados del suelo del jardín botánico de la Univerisdad Tecnológica de Pereira* , Trabajo para optar al título de Licenciatura en Biologia , *Univerisdad Tecnológica de Pereira* , Pereira,Colombia.

- Hernández, R. S., Collado, C. F., & Lucio, M. d. (2014). *Metodología de la investigación*, Editorial McGraw-Hill,5.
- Jiménez, R. (1994). Tecnología de las Fermentaciones y Escalado de Procesos Biológicos, Revista Nature Biotechnology 21, 582 – 583.
- Levi,D. (2018). *Diseño conceptual de un biorreactor para la producción de biomasa de azotobacter chroococcum a escala banco*, Para optar al título de Ingeniería Química ,Universidad de America, Bogota ,Colombia.
- Llop, A., Váldez-Dapenna, M., & Zuazo, J. (2001). *Microbiología y Parasitología Médicas*, Editorial Ciencias Médicas ,8 , 34-38.
- Martinez, R. (28 de Febrero de 2018). *Bioeconomía de los Biofertilizantes*, Periódico de Barcelona,15.
- Mendizábal., Y. (2012). *Potencial de la cepa CPA-8 de B.Subtilis como agente de biocontrol de enfermedades de postcosecha de frutas*, Para optar al título de Doctorado en tecnología de alimentos, Universidad de Lleida, España.
- Mendoza, Ing. Johana Lisseth O`Connor. (2019). *Descifrando el contenido microbiano de bioinsumos comerciales para el diseño de un consorcio con potencial biofertilizante*, Para optar al título de Maestría en Biotecnología, Managua, Nicaragua.
- Monjaras, A. (20 de Junio de 2016). *Microorganismos de montaña*, Editorial Vía Orgánica, 8,12-15.

Moranto, F. (12 de Noviembre de 2015). *“Mecanismos de consorcios bacterianos”*,

Recuperado de: <https://cutt.ly/on9QXyX>

Noriega, L. (2014). *Procesos Químicos Industriales*, Editorial Barcelona, 6, 12-21.

Northland Community and Technical College. (13 de Enero de 2021). *Microbiology Biotechnology*, Editorial Northland, 190.

Olivares, T. (2018). *Apuntes de Bioingeniería*, *Revista de la Universidad Autónoma de Baja California*, 2, 120.

Ortiz, F., & Alfaro, A. (Abril de 2006). *¿Quién destruirá el ecosistema del río Mico? Centro Nacional de Información y Documentación Agropecuaria (CENIDA)*, Trabajo para optencion de técnico agrícola, Univerisad Nacional Agraria, Managua, Nicaragua.

Páramo, L. (1997). *Referencia Personal*, Univercidad Nacional de Ingeniería. Managua, Nicaragua.

Paramo, L. (2020). *Referecia Personal*, Universidad Naciona de Ingeniería, Managua, Nicaragua.

Pearson, D. (1976). *Técnicas de Laboratorio Para el Análisis de alimentos*, Editorial Acribia S.A, 7, doi: 10.1002/0470011149.

Peña, R. D. (1 de Junio de 2016). *Técnicas de escalamientos aplicadas a diseños químicos*, *Revista Dokumen*, 15-30.

- Peñata, L. N. (2015). *Efecto de un bioinoculante a partir de consorcios microbianos nativos fosfato solubilizadores, en el desarrollo de pastos Angleton (Dichantium aristatum)*. *Revista Colombiana de Biotecnología*, 17, 122-130.
- Piad, R. (2017). *Bioquímica de los microorganismos (Discurso principal)*, Universidad Politécnica de Nicaragua.
- Portillo, N. (2009). *Producción de bacterias del género Bacillus, Base de datos SCIELO, volumen 52,2-8*.
- Roger, L. (2019). *Reducción de Fertilizantes, Revista la Prensa*, 4, Managua, Nicaragua.
- Raffino, M. E. (2020). *Obtenido de Concepto de Fisión Binaria*, Recuperado de : <https://es.khanacademy.org/>.
- RAJ, G. (2006). *Fermentation Technology and Biorreactor Design*, Revista KARANTHAND,8.
- Ramirez, C. L. (2020). *Esbozo de un proyecto de curso para el diseño de la producción de levadura, Revista de santiago chile*, 5-17.

## Capítulo 8. Anexos

### Anexo 1. Cuadro de factores del método de Lane y Eylon Fuente: Pearson (1976)

Título mL	Azúcar Inv. no sacarosa	Azúcar Inv. +1g de sacarosa por 100 mL	Azúcar Inv. +5g de sacarosa por 100 mL	Azúcar Inv. + 10g de sacarosa por 100mL	Dextrosa	Levulosa
15	50.5	49.9	47.6	46.1	49.1	52.2
16	50.6	50	47.6	46.1	49.2	52.3
17	50.7	50.1	47.6	46.1	49.3	52.3
18	50.8	50.1	47.6	46.1	49.3	52.4
19	50.8	50.2	47.6	46.1	49.4	52.5
20	50.9	50.2	47.6	46.1	49.5	52.5
21	51	50.2	47.6	46.1	49.5	52.6
22	51	50.3	47.6	46.1	49.6	52.7
23	51.1	50.3	47.6	46.1	49.7	52.7
24	51.2	50.3	47.6	46.1	49.8	52.8
25	51.2	50.4	47.6	46	49.8	52.8
26	51.3	50.4	47.6	46	49.9	52.9
27	51.4	50.4	47.6	46	49.9	52.9
28	51.4	50.5	47.7	46	50	53
29	51.5	50.5	47.7	46	50	53.1
30	51.5	50.5	47.7	46	50.1	53.2
31	51.6	50.6	47.7	45.9	50.2	53.2
32	51.6	50.6	47.7	45.9	50.2	53.3
33	51.7	50.6	47.7	45.9	50.3	53.3
34	51.7	50.6	47.7	45.8	50.3	53.4
35	51.8	50.7	47.7	45.8	50.4	53.4
36	51.8	50.7	47.7	45.8	50.4	53.5
37	51.9	50.7	47.7	45.7	50.5	53.5
38	51.9	50.7	47.7	45.7	50.5	53.6
39	52	50.8	47.7	45.7	50.6	53.6
40	52	50.8	47.7	45.6	50.6	53.6
41	52.1	50.8	47.7	45.6	50.7	53.7
42	52.1	50.8	47.7	45.6	50.7	53.7
43	52.2	50.8	47.7	45.5	50.8	53.8
44	52.2	50.9	47.7	45.5	50.8	53.8
45	52.3	50.9	47.7	45.4	50.9	53.9
46	52.3	50.9	47.7	45.4	50.9	53.9
47	52.4	50.9	47.7	45.3	51	53.9
48	52.4	50.9	47.7	45.3	51	54
49	52.5	51	47.7	45.2	51	54
50	52.5	51	47.7	45.2	51.1	54

**Anexo 2. Cuadro de absorbancias de cada bacteria que conforma el consorcio bacteriano con propiedades Biofertilizadoras. Fuente Propia**

Absorbancia O.D (650)				
Tiempo horas (h)	<i>P.Mendocina</i> (Abs)	<i>B.Megaterium</i> (Abs)	<i>B.Marisflavi</i> (Abs)	<i>E.Aurantiacum</i> (Abs)
0	0.29	0.34	0.16	0.17
0.30	0.43	0.64	0.28	0.39
1.00	0.57	0.76	0.46	0.65
1.30	0.64	1.07	0.58	0.83
2.00	0.69	1.16	0.67	0.84
2.30	0.73	1.21	0.82	0.94
3.00	0.79	1.34	0.87	0.92
3.30	0.81	1.39	0.93	0.98
4.00	0.94	1.41	1.18	1.10
4.30	1.02	1.74	1.30	1.17
5.00	1.23	1.76	1.32	1.27
5.30	1.28	1.73	1.60	1.50
6.00	1.47	1.90	1.67	1.58
6.30	1.58	1.92	1.70	1.85
7.00	1.47	1.93	1.93	1.90
7.30	1.61	1.98	1.83	1.87



**Anexo 3. Cuadro de Unidades Formadoras de Colonias (UFC) de cada bacteria que conforma el consorcio bacteriano con propiedades Biofertilizadoras. Fuente Propia.**

UFC				
Tiempo horas (h)	<i>P.Mendocina</i> (UFC)	<i>B.Megaterium</i> (UFC)	<i>B.Marisflavi</i> (UFC)	<i>E.Aurantiacum</i> (UFC)
0	3.20E+04	5.00E+04	4.05E+04	4.90E+04
0.30	3.30E+04	5.50E+04	4.50E+04	4.95E+04
1.00	1.70E+05	6.00E+05	5.00E+05	4.94E+05
1.30	5.00E+05	7.14E+06	6.10E+05	6.20E+05
2.00	3.00E+06	9.00E+06	6.30E+06	6.55E+06
2.30	5.22E+06	1.40E+07	1.14E+07	1.30E+07
3.00	1.09E+07	1.70E+07	1.40E+07	1.55E+07
3.30	1.30E+07	1.90E+07	1.49E+07	1.73E+07
4.00	1.33E+07	2.11E+07	1.50E+07	1.75E+07
4.30	1.40E+07	2.20E+07	1.67E+07	1.91E+07
5.00	1.50E+07	2.23E+07	1.80E+07	1.93E+07
5.30	1.54E+07	2.30E+07	1.85E+07	1.90E+07
6.00	1.56E+07	2.40E+07	1.89E+07	1.93E+07
6.30	1.62E+07	2.49E+07	1.93E+07	1.96E+07
7.00	1.73E+07	2.60E+07	1.95E+07	2.13E+07
7.30	1.75E+07	2.80E+07	1.99E+07	2.25E+07

**Anexo 4. Cuadros de parámetros cinéticos para cada bacteria. Fuente: Propia**

**Anexo 4.1 Cuadros de parámetros cinéticos para *B. megaterium***

Tabla de Resultados " <i>Bacillus Megaterium</i> " LS5-IIB				
tiempo horas (h)	UFC	Log(x)	$\mu$	OD650(Abs)
0	5.00E+04	4.69019608		0.34
0.30	5.50E+04	4.6946052	0.02923438	0.64
1.00	6.00E+05	5.69372695	0.28281447	0.76
1.30	7.14E+06	5.79239169	0.56901538	1.07
2.00	9.00E+06	6.8162413	0.02080502	1.16
2.30	1.40E+07	7.11394335	0.09072923	1.21
3.00	1.70E+07	7.1903317	0.01675778	1.34
3.30	1.90E+07	7.2380461	0.02219504	1.39
4.00	2.11E+07	7.24303805	0.00890793	1.41
4.30	2.20E+07	7.28103337	0.00824554	1.74
5.00	2.23E+07	7.28555731	0.001144	1.76
5.30	2.30E+07	7.2787536	0.00608337	1.73
6.00	2.40E+07	7.28555731	0.00358228	1.90
6.30	2.49E+07	7.29225607	0.00721335	1.92
7.00	2.60E+07	7.3283796	0.00362159	1.93
7.30	2.80E+07	7.35218252	0.01443702	1.98

**Anexo 4.2 Cuadros de parámetros cinéticos para *P. mendocina***

Tabla de Resultados " <i>Pseudomona Mendocina</i> " RIVB-08				
tiempo horas (h)	UFC	Log(x)	$\mu$	OD650(Abs)
0	3.20E+04	4.50514998		0.29
0.30	3.30E+04	4.51851394	0.00987328	0.43
1.00	1.70E+05	5.23044892	0.20901992	0.57
1.30	5.00E+05	5.69897	0.28596116	0.64
2.00	3.00E+06	6.47712125	0.18284386	0.69
2.30	5.22E+06	6.7176705	0.12155094	0.73
3.00	1.09E+07	7.0374265	0.06643015	0.79
3.30	1.30E+07	7.11394335	0.03604721	0.81
4.00	1.33E+07	7.12385164	0.00198833	0.94
4.30	1.40E+07	7.14612804	0.01040712	1.02
5.00	1.50E+07	7.17609126	0.00597738	1.23
5.30	1.54E+07	7.18752072	0.00530482	1.28
6.00	1.56E+07	7.1931246	0.00111338	1.47
6.30	1.62E+07	7.20951501	0.00758677	1.58
7.00	1.73E+07	7.2380461	0.0056423	1.47
7.30	1.75E+07	7.24303805	0.00229815	1.61

### Anexo 4.3 Cuadros de parámetros cinéticos para *B. marisflavi*

Tabla de Resultados " <i>Bacillus Marisflavi</i> " MIVB-01				
tiempo horas (h)	UFC	Log(x)	$\mu$	OD650(Abs)
0	4.05E+04	4.60745502		0.16
0.30	4.50E+04	4.65321251	0.03294065	0.28
1.00	4.00E+05	5.60205999	0.28961088	0.46
1.30	9.10E+05	5.95904139	0.05013306	0.58
2.00	6.30E+06	6.79934055	0.23071465	0.67
2.30	1.14E+07	7.05690485	0.1239364	0.82
3.00	1.40E+07	7.14612804	0.01794875	0.87
3.30	1.49E+07	7.17318627	0.01259756	0.93
4.00	1.50E+07	7.17609126	0.00057842	1.18
4.30	1.67E+07	7.22271647	0.02158761	1.30
5.00	1.80E+07	7.25527251	0.00642475	1.32
5.30	1.85E+07	7.26717173	0.00546245	1.60
6.00	1.89E+07	7.2764618	0.00182507	1.67
6.30	1.93E+07	7.28555731	0.00416403	1.70
7.00	1.95E+07	7.29003461	0.00087765	1.93
7.30	1.99E+07	7.29885308	0.00402976	1.83

### Anexo 4.4 Cuadros de parámetros cinéticos para *E. aurantiacum*

Tabla de Resultados " <i>Exiguobacterium Aurantiacum</i> " MVIB-02				
tiempo horas (h)	UFC	Log(x)	$\mu$	OD650(Abs)
0	4.90E+04	4.69019608		0.17
0.30	4.95E+04	4.6946052	0.0031321	0.39
1.00	4.94E+05	5.69372695	0.27564431	0.65
1.30	6.20E+05	5.79239169	0.05726748	0.83
2.00	6.55E+06	6.8162413	0.23251845	0.84
2.30	1.30E+07	7.11394335	0.14249507	0.94
3.00	1.55E+07	7.1903317	0.01525799	0.92
3.30	1.73E+07	7.2380461	0.02204664	0.98
4.00	1.75E+07	7.24303805	0.00098492	1.10
4.30	1.91E+07	7.28103337	0.0174402	1.17
5.00	1.93E+07	7.28555731	0.00088734	1.27
5.30	1.90E+07	7.2787536	0.00311433	1.50
6.00	1.93E+07	7.28555731	0.00133471	1.58
6.30	1.96E+07	7.29225607	0.00306345	1.85
7.00	2.13E+07	7.3283796	0.00705922	1.90
7.30	2.25E+07	7.35218252	0.01080928	1.87