

## Optimización del medio de cultivo y las condiciones de fermentación para la producción de un biofertilizante a base de *Pseudomonas fluorescens*

María Cristina Pérez Peñaranda<sup>1\*</sup>, Julio Oramas García<sup>1</sup>, Emilio Arcadio Sotolongo Valdés<sup>2</sup>, Alina Miranda Galuzzo<sup>3</sup>, Yoandra Román Tabio<sup>1</sup>, Alain González Soto<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Unidad de Desarrollo–Innovación del Grupo Empresarial Laboratorios Biológicos Farmacéuticos (LABIOFAM). Ave. Independencia km 16 ½. Boyeros. La Habana. Cuba.

<sup>2</sup>Facultad de Ingeniería Química, Universidad Tecnológica de La Habana. Calle 114, No. 11901, entre Ciclovía y Rotonda. Marianao. La Habana. Cuba.

<sup>3</sup>Unidad Empresarial de Base VIMANG-LABIOFAM. Arroyo Naranjo. La Habana. Cuba.

\*Autora para correspondencia e-mail: esp14desarrollo@labiofam.cu; mcperezpenaranda@gmail.com

### RESUMEN

En Cuba se ha desarrollado un biofertilizante a base de una cepa de *Pseudomonas fluorescens*, solubilizadora de fosfatos. Ante la necesidad de estandarizar su escalado industrial este trabajo tuvo por objetivo optimizar el medio de cultivo y las condiciones de fermentación. Primero se realizaron ensayos a escala de zaranda y posteriormente en un fermentador. En cada caso se realizó una validación experimental. Para la optimización del medio de cultivo se empleó un diseño compuesto central para ajustar superficies de respuesta. Se aplicó un diseño factorial  $2^3$  con puntos estrellas equidistantes y seis repeticiones en el centro del plan considerado como cero. Se realizaron un total de 20 corridas experimentales, con tres repeticiones cada una y se determinó la ecuación de regresión. Como variable de respuesta se determinó el crecimiento celular por densidad óptica  $\lambda = 600$  nm ( $DO_{600}$ ). Para optimizar del crecimiento microbiano en función de la velocidad de agitación y el flujo de aire se empleó un fermentador de 12 litros de volumen total con 8.5 litros de volumen efectivo con un diseño factorial  $2^2$ , tomando como variable de respuesta la  $DO_{600}$ . Se comprobó que para la producción industrial de *P. fluorescens* y la formulación del bioproducto puede emplearse un medio de cultivo semisintético optimizado, sin melaza, que unido al empleo de una velocidad de agitación y flujo de aire óptimos permiten incrementar el contenido de biomasa bacteriana. Las nuevas condiciones permitieron reducir el tiempo de fermentación a 12 horas con respecto a las 20 a 22 horas que se empleaban en el esquema de producción. Además, se redujo el 29%, 50% y 40%, respectivamente de las fuentes de carbono, nitrógeno y fósforo.

Palabras clave: bioproducto, diseño compuesto central, metodología de superficie respuesta

### Optimization of the culture medium and fermentation conditions for *Pseudomonas fluorescens*-based biofertilizers production

#### ABSTRACT

In Cuba, a biofertilizer has been developed based on a *Pseudomonas fluorescens* strain phosphate solubilizer. Given the need to standardize its industrial scale up, this work aimed to optimize the culture medium and the fermentation conditions. First, tests in the shaker were carried out and then in a fermenter. In each case an experimental validation was performed. For the optimization of the culture medium, a central composite design was used to adjust response surfaces. A  $2^3$  factorial design with equidistant star points and six repetitions in the center of the plan considered zero was applied. A total of 20 experimental runs were performed, with three repetitions each

and the regression equation was determined. As a response variable, cell growth was determined by optical density  $\lambda = 600$  nm ( $OD_{600}$ ). To optimize microbial growth based on agitation speed and air flow, a 12-liter total volume fermenter with 8.5 liters of effective volume with a factorial design  $2^2$  was used, taking  $OD_{600}$  as the response variable. It was found that for the industrial production of *P. fluorescens* and the formulation of the bioproduct, an optimized semisynthetic culture medium can be used, without molasses. Together with the employed of optimal agitation speed and air flow, the bacterial biomass content can be increased. The new conditions allowed reducing the fermentation time to 12 hours compared to the 20 to 22 hours used in the production scheme. In addition, 29%, 50% and 40%, respectively, of carbon, nitrogen and phosphorus sources were reduced.

Keywords: bioproduct, central composite design, response surface methodology

## INTRODUCCIÓN

Debido a que la demanda de alimentos en el mundo aumenta, mientras que recursos primordiales como el suelo y el agua se pierden rápidamente, la agricultura debe ser una actividad que conserve el suelo y mejore las condiciones de aquellos que ya se han degradado. Ante esta situación, la comunidad científica desempeña una labor decisiva en la búsqueda de posibles soluciones para la mitigación de los daños al medio ambiente, e incrementar la producción agrícola (Aguado-Santacruz, 2012). Una de las alternativas para vencer dichos retos es el uso de bioproductos en la agricultura. Entre estos, los biofertilizantes son preparados que contienen microorganismos vivos o latentes (bacterias u hongos, solos o combinados) y, que al ser inoculados pueden vivir en simbiosis con las plantas y le ayudan a su nutrición y protección (Gagreda-Cabrera *et al.*, 2012; Chojnacka, 2015).

El fósforo (P) es uno de los macronutrientes más limitantes para la productividad de los cultivos y su deficiencia es un fenómeno común en suelos agrícolas en todo el mundo. A pesar de la aplicación a largo plazo de fertilizantes a base de fosfatos para aumentar los rendimientos de los cultivos, la disponibilidad de P a menudo es baja. Las plantas obtienen este elemento de la solución del suelo, principalmente de las formas inorgánicas más disponibles, pero debido a su alta reactividad química y su demanda, su disponibilidad se reduce rápidamente (Tapia, 2013; Zhu *et al.*, 2018). En este contexto, la actividad microbiana es de gran trascendencia, al solubilizar los fosfatos no disponibles para la planta, los cuales se encuentran bajo formas orgánicas e inorgánicas. Las bacterias del suelo del género *Pseudomonas*, son particularmente activas como solubilizadoras de fosfatos (Cuervo, 2010; Otieno *et al.*, 2015).

En procesos de fermentación microbiana para obtener bioproductos con bacterias solubilizadoras de fosfatos se requiere identificar las variables independientes y sus valores óptimos que mayor influencia tienen en el rendimiento del producto deseado. No obstante, es una actividad compleja ya que interactúan varios factores.

El análisis de una variable a la vez en un proceso de fermentación es laborioso, consume tiempo y los resultados generalmente carecen de valor predictivo. Estas limitaciones pueden ser resueltas con el empleo de técnicas estadísticas multivariadas que permiten optimizar las condiciones de fermentación tomando en consideración la interacción entre los factores (Bezerra *et al.*, 2008). Es posible por ejemplo, encontrar el nivel óptimo de cada variable independiente usando el diseño compuesto central (DCC) bajo la metodología de superficie de respuesta (MSR) (Rao *et al.*, 2000; Box *et al.*, 2005; Bezerra *et al.*, 2008). Resultados satisfactorios han sido referidos con este enfoque por varios autores (Abdel-Fattah y Olama, 2002; Xiong *et al.*, 2008; Abo-Zaid *et al.*, 2015).

En Cuba se ha desarrollado un biofertilizante a base de una cepa de *Pseudomonas fluorescens*, solubilizadora de fosfatos, que se caracteriza por su alta capacidad de solubilizar el fósforo mineral y orgánico, por producir sustancias estimuladoras del crecimiento vegetal y antibióticos (Bach, 2002). Ha sido utilizado con resultados positivos en varios cultivos (Bach, 2002; Dibut *et al.*, 2006; Díaz-Blanco y Márquez-Reina, 2011). Para elaborar el medio de cultivo se emplea melaza cuya composición y calidad varían según el rendimiento. Ante la necesidad de estandarizar su escalado industrial mediante un proceso de

fermentación y mejorar la calidad de su formulación, este trabajo tuvo por objetivo optimizar el medio de cultivo y las condiciones de fermentación de la bacteria.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### *Cepa bacteriana*

Se empleó una cepa de *Pseudomonas fluorescens*, conservada por liofilización, del Cepario de la Unidad Productora de Vacunas Virales y Bacterianas (UP-7) de LABIOFAM.

Con el objetivo de optimizar el medio de cultivo para el crecimiento de la bacteria se realizaron ensayos a escala de zaranda y posteriormente se optimizaron las condiciones de fermentación velocidad de agitación y flujo de aire en un fermentador con 8.5 litros de volumen efectivo. En cada caso se realizó una validación experimental. Se propuso un diseño factorial para la sustitución de melaza en el medio de cultivo inicial por otra fuente de carbono y la variación de la composición de la fuente de nitrógeno y fósforo. La duración del proceso fermentativo inicial era de 20-22 horas para obtener la biomasa a partir de la cepa bacteriana.

### Optimización de medio de cultivo a escala de zaranda

Se realizó el diseño y la formulación del medio de cultivo teniendo en consideración la composición elemental de las bacterias (Scragg, 1997). La optimización se realizó mediante un diseño compuesto central (DCC) para ajustar superficies de respuesta siguiendo la metodología de Box *et al.* (2005).

Los niveles de los factores se determinaron según ensayos preliminares y la composición previa del medio de cultivo para obtener el

biofertilizante a base de *P. fluorescens*. Se tomaron como variables independientes las concentraciones de las fuentes de carbono, nitrógeno y fósforo. Cada factor con dos niveles: alto y bajo (+1, -1).

Como variable de respuesta se determinó el crecimiento celular (biomasa) por lectura de Densidad Óptica  $\lambda = 600$  nm ( $DO_{600}$ ). Se aplicó un diseño factorial  $2^3$  con puntos estrellas equidistantes y seis repeticiones en el centro del plan considerado como cero. Se realizaron un total de 20 corridas experimentales, con tres repeticiones cada una y se determinó la ecuación de regresión. Para la representación gráfica se utilizó la metodología de superficie respuesta. Las variaciones de los parámetros se presentan en la tabla 1.

Con las combinaciones que el análisis de superficie de respuesta arrojó como óptimas para la mayor producción de biomasa, se realizó una fermentación para validar experimentalmente los resultados.

### Obtención del preinóculo

Se prepararon tres Erlenmeyers con 100 ml del medio de cultivo formulado con las concentraciones de la fuente de carbono, nitrógeno y fósforo correspondientes al centro del plan. Se esterilizó en autoclave a 121 °C y 111.5 kPa durante 25 minutos. Luego se adicionaron 2 ml del medio de cultivo a cada tubo de la cepa conservada, se agitó hasta desprender el cultivo y la suspensión de células obtenida se añadió a cada Erlenmeyer. El preinóculo permaneció en zaranda durante 18 horas a 220 rpm. Mediante la observación de los caracteres morfológicos de las células bacterianas en la tinción de Gram se comprobó la pureza del cultivo.

Tabla 1. Concentraciones de Fuentes de Nutrientes ( $g\ l^{-1}$ ) para la optimización de medio de cultivo a escala de zaranda en la fermentación de *Pseudomonas fluorescens*.

Variables	Nivel Bajo (-1)	Centro del Plan (0)	Nivel Alto (1)
Carbono C ( $X_1$ )	10.00	12.00	14.00
Nitrógeno N ( $X_2$ )	2.00	4.00	6.00
Fósforo F ( $X_3$ )	1.75	3.75	5.00

### Optimización del medio de cultivo

Los medios de cultivo para la fermentación en zaranda se prepararon en Erlenmeyers de 250 ml de capacidad con un volumen de 90 ml del medio de cultivo formulado según el diseño experimental factorial 2<sup>3</sup> con tres repeticiones de cada tratamiento. La esterilización del medio de cultivo se realizó en autoclave a 121 °C y 111.5 kPa durante 25 minutos. Los Erlenmeyers se inocularon con 10 ml de preinóculo para un volumen total de 100 ml y se colocaron en zaranda 12 horas a 30 °C y 220 rpm. Se midió la DO<sub>600</sub> y el pH al inicio de la fermentación y cada dos horas hasta concluir el experimento. Se comprobó la pureza mediante tinción de Gram.

### Determinación de biomasa

El incremento en biomasa se determinó por masa seca (mg), se tomaron muestras por duplicado de 1.5 ml de cada dilución en tubos de ensayo (Eppendorfs) previamente secados a 50 °C por 24 h y luego pesados. Los cultivos bacterianos se centrifugaron a 14 000 rpm por 20 minutos a 4 °C y el sobrenadante fue decantado. Los tubos se llevaron al horno a 50 °C hasta lograr peso constante y se utilizó como blanco el medio de cultivo sin inocular.

Para la determinación de la DO<sub>600</sub> se tomaron muestras por duplicado de 1.5 ml de cada dilución en tubos de ensayo (Eppendorfs) y se realizó la curva patrón de masa seca (mg).

Se realizaron mediciones de la DO<sub>600</sub> al inicio y posteriormente cada dos horas para cada réplica de los medios de cultivo ensayados hasta la fase estacionaria del cultivo, y se construyó la curva de crecimiento.

Además, se cuantificaron los azúcares reductores mediante la técnica del ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS) (Miller, 1959).

Los parámetros cinéticos calculados fueron biomasa producida ( $\bar{X}$ ), velocidad específica máxima de crecimiento ( $\mu_{m\acute{a}x}$ ) y rendimiento  $Y_{x/s}$ . El  $Y_{x/s}$  se calculó como la relación entre la biomasa producida (g) y el consumo total de sustrato (g) ( $\bar{S}$ ) (Doran, 2013). A partir de los datos de la curva de crecimiento se graficó el logaritmo natural de la concentración de células en función del tiempo según la ecuación:

$$\ln x = \ln x_0 + \mu_{m\acute{a}x}(t - t_0)$$

### Optimización de las condiciones de fermentación

Para optimizar las condiciones de fermentación se empleó un fermentador de 12 litros de volumen total con 8.5 litros de volumen efectivo. Se tuvieron en cuenta los resultados de la optimización del medio de cultivo y se analizó el efecto de la velocidad de agitación y el flujo de aire sobre la producción de biomasa de la bacteria.

Se empleó un diseño factorial 2<sup>2</sup> con tres repeticiones en el centro del plan, para un total de 11 corridas experimentales. Como variable de respuesta se determinó el crecimiento celular por DO<sub>600</sub> y se correlacionó con la curva patrón de masa seca obtenida.

Se determinó la ecuación de regresión. Para la representación gráfica se utilizó la metodología de superficie respuesta. Los parámetros para la fermentación de 8.5 l de volumen efectivo se presentan en la tabla 2.

Para validar experimentalmente los resultados, con las combinaciones que el análisis de superficie de respuesta arrojó como óptimas para la mayor producción de biomasa, se realizó una fermentación discontinua durante 12 horas utilizando el medio de cultivo optimizado. El pH se ajustó a 7.4 antes de esterilizar. La concentración

Tabla 2. Factores y niveles empleados en la optimización de la velocidad de agitación y el flujo de aire en fermentador de 8.5 l de volumen efectivo.

Parámetro	Condiciones		
	Nivel bajo	centro del plan	nivel alto
	(-1)	(0)	(+1)
Velocidad de agitación (rpm)	600	700	800
Flujo de aire(vvm)	1.2	1.0	0.8

de azúcares expresados como reductores al inicio de la fermentación fue de 9.93 g l<sup>-1</sup>. Se realizó la curva de crecimiento a partir de mediciones de DO<sub>600</sub> cada dos horas y se determinó el consumo de sustrato por el método del DNS.

Para la obtención del preinóculo de la fermentación se prepararon dos Erlenmeyers con 500 ml del medio de cultivo optimizado y se esterilizó en autoclave a 121 °C y 111.5 kPa durante 30 minutos. Luego se adicionaron 10 ml del medio de cultivo a dos tubos de cultivo de *P. fluorescens*, se agitaron hasta desprender el cultivo y la suspensión de células obtenida se inoculó en cada Erlenmeyers. Estos se mantuvieron en zaranda a 220 rpm durante 12 horas. Se realizó evaluación de la pureza mediante tinción de Gram.

Se prepararon para la fermentación 7.5 l del medio de cultivo optimizado y se esterilizó en autoclave a 121 °C y 111.5 kPa durante 45 minutos. Luego se inocularon con un litro de preinóculo para un volumen total de 8.5 l. La fermentación se realizó durante 12 horas, a 30 °C.

Se realizaron mediciones de la DO<sub>600</sub> al inicio y posteriormente cada dos horas para cada réplica de los medios ensayados hasta completar 12 horas. Con los resultados de la DO<sub>600</sub> a partir de la curva patrón realizada se determinaron los valores de crecimiento de biomasa en (g l<sup>-1</sup>), con los que se construyó la curva de crecimiento de la cepa. Se realizó evaluación de la pureza mediante tinción de Gram.

*Tratamiento estadístico de los resultados experimentales*

Los diseños experimentales empleados y los análisis estadísticos realizados fueron generados y ejecutados mediante software *Statistic Package for Social Science (SPSS)* versión XV- Centurión y Microsoft Excel para Windows. En ambos procesos de optimización se obtuvo un modelo que representa la curva de regresión con los coeficientes significativos. En cada caso se realizó un análisis de varianza y se mostraron los resultados a través de diagramas de Pareto. El intervalo de confianza establecido fue de 95%, tomando como significativos aquellos factores que tenían un valor de Probabilidad (P) >F menor de 0.05.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Optimización de medio de cultivo a escala de zaranda

Al considerar el efecto de las tres variables independientes (concentraciones de carbono, fósforo y nitrógeno) en el diseño factorial utilizado, se obtuvo una ecuación de la forma:

$$Y=b_0+b_1X_1+b_2X_2+b_{11}X_1^2+b_{12}X_1X_2+b_{22}X_2^2$$

Se comprobó que una disminución en las concentraciones de las fuentes analizadas, favoreció la producción de biomasa (Figura 1). Las fuentes de carbono, nitrógeno y fósforo fueron significativas con 95% de nivel de confianza. Los resultados se correspondieron con los informados en el análisis de varianza por otros autores (Xiong

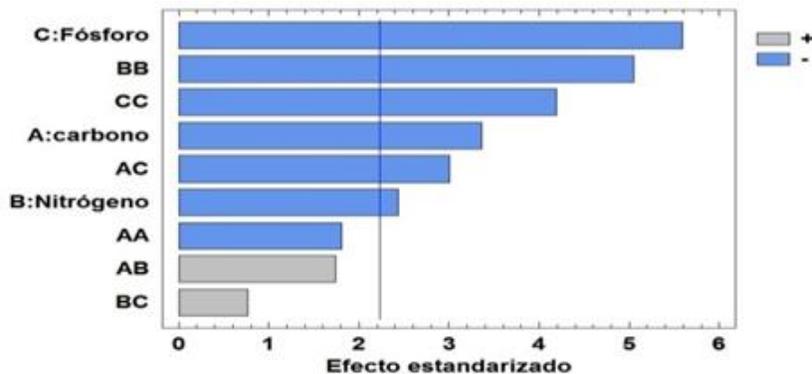


Figura 1. Diagrama de Pareto del efecto de las fuentes de carbono, nitrógeno y fósforo en la optimización del medio de cultivo para la producción de biomasa.

*et al.*, 2008; Wang y Wan, 2009). El aumento en la concentración de la fuente de carbono, puede disminuir la producción de biomasa de la cepa, como una posible consecuencia a la inhibición del crecimiento por exceso de sustrato (van Keulen *et al.*, 2011).

El análisis mediante la metodología de superficie respuesta evidenció que la variable dependiente se incrementó cuando las fuentes de carbono y de amonio se encontraban en

el nivel bajo (Figura 2). Resultados similares fueron observados por Becerra (2007).

Por otra parte, el crecimiento de biomasa mostró su máximo valor cuando las concentraciones de carbono y fósforo se encontraban en el nivel bajo y alto respectivamente (Figura 3). Cuando los dos factores se hallaban en el nivel alto se observó una disminución en la producción de biomasa, lo que confirmó el efecto negativo de esta interacción.

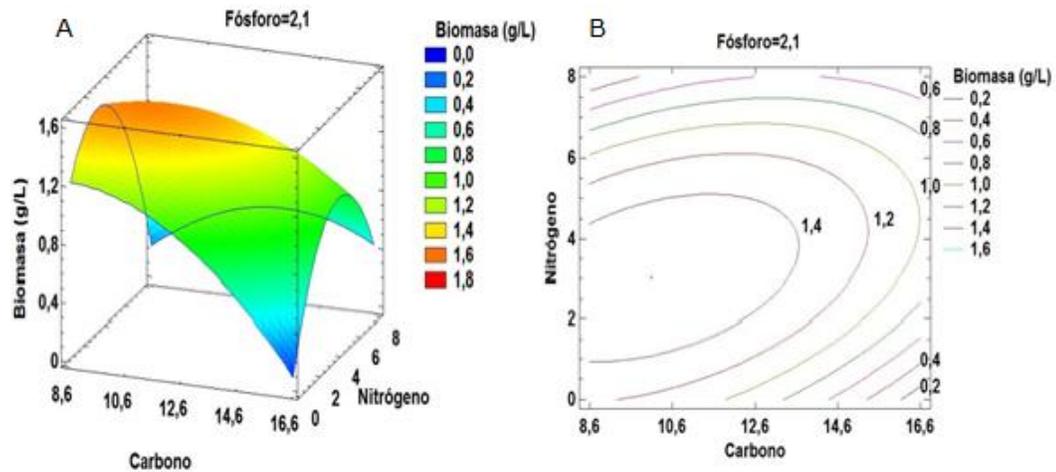


Figura 2. Gráficas de superficie de respuesta (A) y de contorno (B) entre las variables que representan las fuentes de carbono y fósforo.

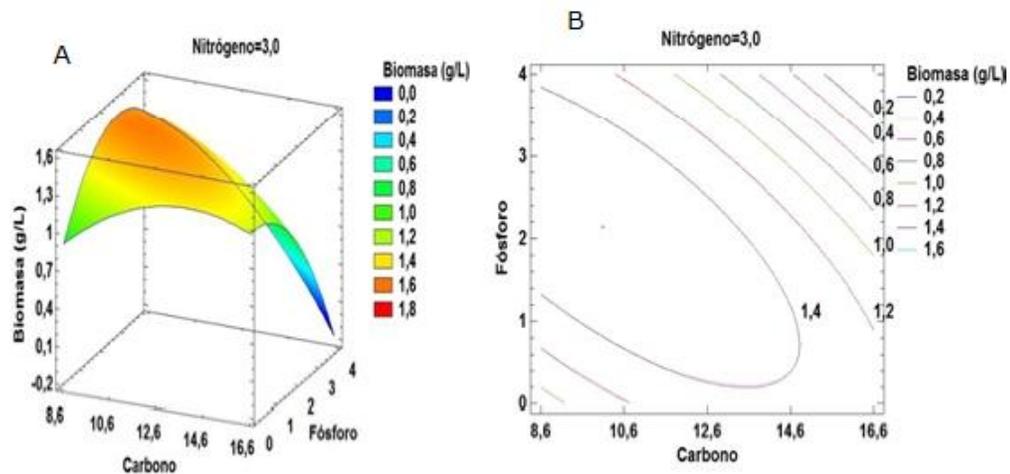


Figura 3. Gráficas de superficie de respuesta (A) y de contorno (B) entre las variables que representan las fuentes de carbono y nitrógeno.

Sin embargo, la mayor producción de biomasa se obtuvo principalmente por el aumento en la concentración de la fuente de fósforo y un nivel bajo en la concentración de la de nitrógeno (Figura 4). No se evidenció una etapa de adaptación en el microorganismo. Se ha demostrado que si un cultivo exponencial se inocula en el mismo medio de cultivo y en condiciones similares, el crecimiento exponencial se inicia inmediatamente y se reduce el tiempo en la fase de latencia.

La cinética de crecimiento de la cepa de *P. fluorescens* en el medio de cultivo optimizado mostró que la fermentación concluyó a las 12 horas ya que el valor de absorbancia se mantuvo constante en las últimas mediciones realizadas (Figura 5). Este resultado confirmó

que el microorganismo se encontraba en fase estacionaria (Kulkarni, 2002).

Los resultados a nivel de zaranda demostraron la utilidad del empleo de la metodología de superficie respuesta para optimizar el proceso fermentativo (Tabla 3). Esta metodología se aplica ampliamente en procesos analíticos y se ha consolidado por sus innumerables ventajas de generar grandes cantidades de información de un pequeño número de experimentos y la posibilidad de evaluar el efecto de interacción entre las variables en la respuesta (Bezerra *et al.*, 2008). En procesos de fermentación donde intervienen especies de *Pseudomonas* se ha utilizado por diferentes autores con resultados positivos (Dutta *et al.*, 2004; Tanyol *et al.*, 2015).

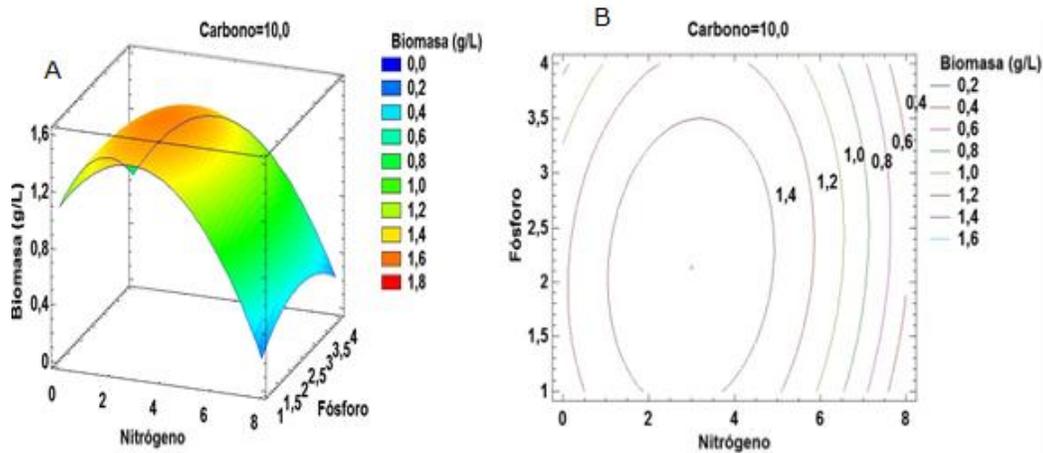


Figura 4. Gráficas de superficie de respuesta (A) y de contorno (B) entre las variables que representan las fuentes de nitrógeno y fósforo.

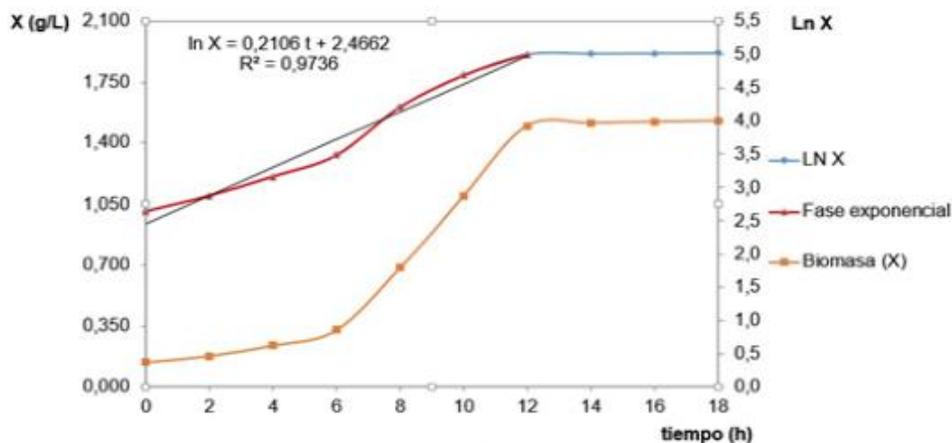


Figura 5. Crecimiento de *Pseudomonas fluorescens* en el medio de cultivo optimizado a nivel de zaranda mediante la metodología de superficie respuesta.

### Optimización de las condiciones de fermentación

El análisis realizado se constató que tanto la velocidad de agitación, como el flujo de aire ejercieron una influencia significativa en el aumento de biomasa en la fermentación para un intervalo de confianza del 95% como se muestra en el diagrama de Pareto (Figura 6).

La aplicación del análisis de regresión generó la ecuación cuadrática: Biomasa ( $\text{g l}^{-1}$ ) =  $1.674 - 0.237 A - 0.514 B - 0.741A^2 + 0.162AB - 0.471 B^2$ .

A partir del modelo de regresión se obtuvo la gráfica de superficie de respuesta para la interacción agitación-flujo de aire (Figura 7) donde se representan los contornos para la producción de biomasa como función de la velocidad de agitación y el flujo de aire. El círculo concéntrico más pequeño de la superficie de contorno se encontró en el intervalo de valores co-dificados de velocidad de agitación-flujo de aire donde el crecimiento

de biomasa alcanzó sus valores máximos. Esta región va desde 640 a 710 rpm y de 0.79 a 0.99 vvm, muy cercana a los niveles centrales 700 rpm y 1 vvm.

A través de la utilización del análisis matemático se determinó que los valores óptimos de velocidad de agitación y flujo de aire fueron de 677 rpm y 0.88 vvm, respectivamente. Se apreció un óptimo local en esta zona para la variable dependiente. Según el modelo matemático con estas condiciones se logró obtener una concentración máxima de biomasa de  $1.76 \text{ g l}^{-1}$ .

Operando el fermentador a 677 rpm se garantiza una concentración de nutrientes homogénea en el recipiente. Esto posibilita una mayor producción de biomasa ya que el microorganismo tiene fácil acceso a los nutrientes requeridos para sus procesos bioquímicos. Sin embargo, a valores superiores disminuye la biomasa ya que la agitación mecánica crea esfuerzos cortantes que pudieran afectar a las estructuras celulares.

Tabla 3. Comparación de los parámetros cinéticos obtenidos en zaranda empleando el medio de cultivo para producción de bioproducto y el medio de cultivo optimizado.

Parámetro	Medio de cultivo bioproducto	Medio de cultivo optimizado
$\mu_{\text{máx}}$ ( $\text{h}^{-1}$ )	0.136	0.201
Producción de biomasa ( $\text{g l}^{-1}$ )	1.024	1.510

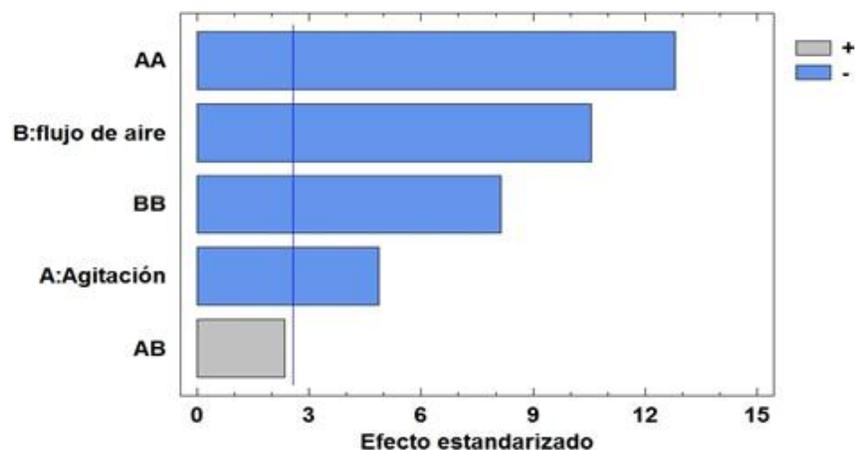


Figura 6. Diagrama de Pareto del efecto de la velocidad de agitación y el flujo de aire en la producción de biomasa.

La validación experimental de los resultados obtenidos en la optimización de las condiciones de velocidad de agitación-flujo de aire mostró que en la curva de crecimiento se obtuvo un valor máximo de producción de biomasa de 1.73 g l<sup>-1</sup> (Figura 8) que se correspondió en un 98.3% al estimado por el modelo predictivo (R<sup>2</sup>=0.9856). Este resultado evidenció que el modelo se correspondió con los datos experimentales.

Cuando cesó el crecimiento celular, no existía un agotamiento completo de la fuente de carbono y energía a pesar de comenzar la fermentación con un valor bajo de azúcares

reductores (9.93 g l<sup>-1</sup>), lo que indicó que la inhibición del crecimiento de la biomasa no ocurrió por agotamiento del sustrato limitante en el proceso (Figura 9) sino quizás por exceso. Al concluir el periodo de fermentación más de la mitad del sustrato no había sido utilizado. Otros autores como Patil *et al.* (2016) en la optimización del medio de cultivo para la producción de arginina deiminasa por *P. putida* observaron una respuesta similar de consumo incompleto de la fuente carbonada que unido a los niveles de nitrógeno condujeron a un incremento del pH que limitó el crecimiento bacteriano. Este aspecto podría considerarse para estudios posteriores.

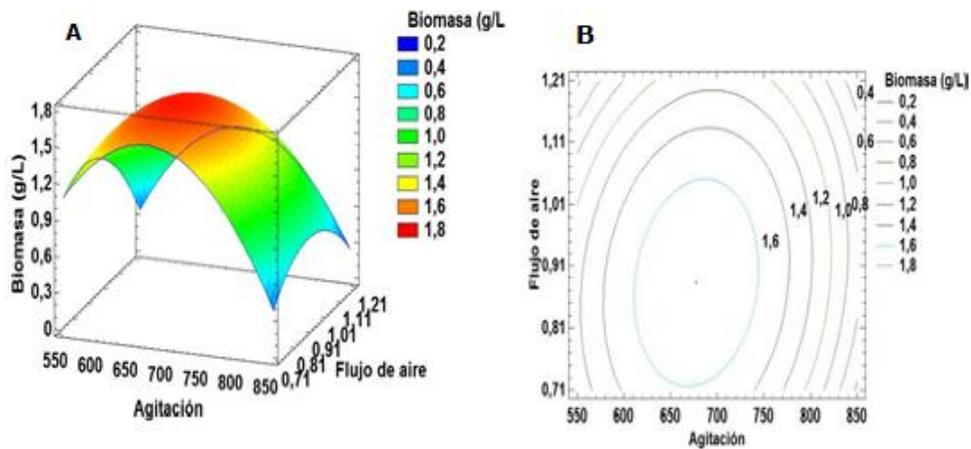


Figura 7. Gráficas de superficie de respuesta (a) y de contorno (b) mostrando el efecto de la velocidad de agitación y el flujo de aire sobre la producción de biomasa de *Pseudomonas fluorescens* en fermentador de 8.5 litros.

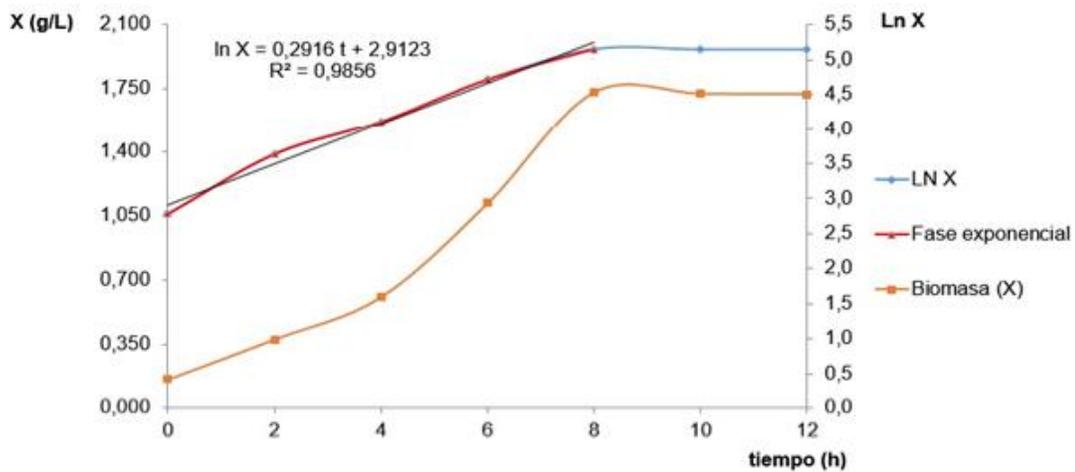


Figura 8. Curva de crecimiento de *Pseudomonas fluorescens* en fermentador de 8.5 litros de volumen efectivo en condiciones de velocidad de agitación y flujo de aire óptimas.

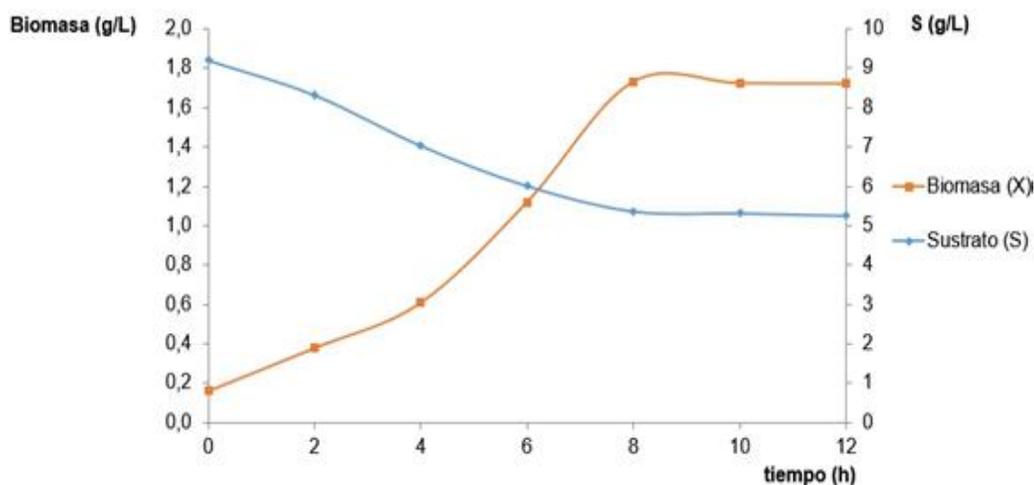


Figura 9. Relación entre la concentración de biomasa y el consumo de azúcares reductores en la fermentación de *Pseudomonas fluorescens* en fermentador de 8.5 litros de volumen efectivo.

Tabla 4. Parámetros cinéticos obtenidos en zaranda y fermentador de 8.5 l de volumen efectivo para la producción de biomasa de *Pseudomonas fluorescens*.

Parámetro	Zaranda	Fermentador 8.5 l
Producción de biomasa ( $\text{g l}^{-1}$ )	1.560	1.760
$\mu_{\text{máx}}$ ( $\text{h}^{-1}$ )	0.209	0.291
$Y_{x/s}$	0.321	0.396

Los parámetros cinéticos obtenidos en el fermentador fueron superiores a los alcanzados en zaranda (Tabla 4), por lo que se obtuvo un mayor aprovechamiento de los componentes del medio de cultivo por la bacteria. Resultados similares fueron obtenidos por Sun *et al.* (2006) cuando emplearon medios de cultivo con la misma concentración inicial de azúcares reductores.

Operando el fermentador bajo las condiciones óptimas de agitación y flujo de aire, disminuyó a 8 horas el tiempo en que el microorganismo finalizó la fase de crecimiento exponencial.

El medio de cultivo semisintético diseñado para la cepa *P. fluorescens* permitió reducir las concentraciones de carbono, nitrógeno y fósforo en 29%, 50% y 44% respectivamente con respecto al medio de cultivo propuesto originalmente. Además, incrementó en un 34% la producción de

biomasa. Las condiciones óptimas de velocidad de agitación y flujo de aire (677 rpm y 0.88 vvm) en la fermentación de 8.5 litros de volumen efectivo redujeron el tiempo de fermentación a 12 horas. En este sentido, se corroboró que la aplicación de técnicas estadísticas de diseño experimental en el desarrollo de procesos de fermentación contribuye a reducir la variabilidad y tiempo del proceso, a disminuir los costos y el número de ensayos a realizar (Box *et al.*, 2005; Bezerra *et al.*, 2008).

#### CONCLUSIONES

Para la producción industrial de *P. fluorescens* y la formulación del bioproducto puede emplearse un medio de cultivo semisintético optimizado, sin melaza, que unido al empleo de una velocidad de agitación y flujo de aire óptimos permiten incrementar el contenido de biomasa bacteriana.

## AGRADECIMIENTOS

Los autores desean agradecer a la Unidad de Desarrollo e Investigación de LABIOFAM, a la Facultad de Ingeniería Química de la Universidad Tecnológica de la Habana y al Fondo Financiero de Ciencia e Innovación (FONCI).

## Conflicto de interés

Los autores no declaran conflicto de intereses.

## REFERENCIAS

Abdel-Fattah YR, Olama ZA (2002) L-asparaginase production by *Pseudomonas aeruginosa* in solid-state culture: evaluation and optimization of culture conditions using factorial designs. *Process Biochemistry* 38: 115-122

Abo-Zaid GA, Wagih EE, Matar SM, Ashmawy NA, Hafez EE (2015) Optimization of pyocyanin production from *Pseudomonas aeruginosa* JY21 using statistical experimental designs. *International Journal of ChemTech Research* 8(9): 137-148

Aguado-Santacruz GA (2012) Introducción al uso y manejo de Biofertilizantes en la agricultura. INIFAP/SAGARPA, México

Bach T (2002) Fosforina, ¿solo una alternativa para la fertilización fosfórica? *Agricultura orgánica* 2: 31-32

Becerra CA (2007) Optimización de un medio de cultivo para la producción de biomasa de la cepa *Pseudomonas putida* UA 44 aislada del suelo bananero de Urabá–Antioquia. Tesis de grado para el título de Ingeniero de Procesos, Universidad EAFIT, Medellín, Colombia

Bezerra MA, Santelli RE, Oliveira EP, Villar LS, Escalera LA (2008) Response surface methodology (RSM) as a tool for optimization in analytical chemistry. *Talanta* 76: 965-977

Box EP, Hunter JS, Hunter WG (2005) *Statistics for Experimenters: Design, Innovation, and Discovery*. Wiley-Interscience, London; ISBN: 978-0-471-71813-0

Chojnacka K (2015) Innovative bio-products for agriculture. *Open Chem* 13: 932–937

Cuervo JP (2010) Aislamiento y caracterización de *Bacillus* spp. como fijadores biológicos de nitrógeno y solubilizadores de fosfatos en dos muestras de biofertilizantes comerciales. Trabajo de Grado presentado como requisito parcial para optar al título de Microbiólogo Agrícola y Veterinario. Pontificia Universidad Javeriana, Bogotá, Colombia

Díaz-Blanco PO, Márquez-Reina E (2011) Validación de los biofertilizantes *Azotobacter*, *Rhizobium* y fosforina en cuatro sistemas de cultivos en condiciones de producción. *Avances* 13(2): 1-9

Doran PM (2013) *Bioprocess engineering principles*. Elsevier Ltd, London; doi: 10.1016/C2009-0-22348-8

Dibut B, Martínez-Viera R, Fey L, Ortega M (2006) Un siglo de investigaciones y comercialización de biofertilizantes en Cuba. *Agrotecnia de Cuba* 30(2): 79-90

Dutta JR, Dutta PK, Banerjee R (2004) Optimization of culture parameters for extracellular protease production from a newly isolated *Pseudomonas* sp. using response surface and artificial neural network models. *Process Biochem* 39: 2193- 2198

Gagreda-Cabrera OA, Díaz-Franco A, Peña-Cabriales JJ, Vera-Niñez JA (2012) Impacto de los biofertilizantes en la agricultura. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas* 3(6): 1261-1274

Kulkarni N (2002) Studies on lipase enzyme from *Pseudomonas fluorescens* NS2W. Thesis of doctor of Philosophy in Microbiology, University of Pune, Maharashtra, India

Miller G (1959) Use of Dinitrosalicilic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar. *Analytical Chemistry* 31: 426-428

Otieno N, Lally R, Kiwanuka S, Lloyd A, Ryan D, Germaine K, Dowling D (2015) Plant growth promotion induced by phosphate solubilizing endophytic *Pseudomonas* isolates. *Frontiers in Microbiology* 6: 745-756; doi: 10.3389/fmicb.2015.00745

Patil MD, Shinde KD, Patel G, Chisti Y, Banerjee UC (2016) Use of response surface method for maximizing the production of arginine

- deiminase by *Pseudomonas putida*. Biotechnology Reports 10: 29–37; doi: 10.1016/j.btre.2016.03.002
- Rao KJ, Kim CH, Rhee SK (2000) Statistical optimization of medium for the production of recombinant hirudin from *Saccharomyces cerevisiae* using response surface methodology. Process Biochemistry 35: 639-647
- Scragg AH (1997) Biotecnología para los ingenieros: Sistemas biológicos en procesos tecnológicos. ed LIMUSA, México
- Sun Z, Ramsay JA, Guay M, Ramsay BA (2006) Automated feeding strategies for high-cell-density fed-batch cultivation of *Pseudomonas putida* KT2440. Microbiol Biotechnol 71(4): 423-431
- Tapia Y (2013) La disponibilidad del fósforo es producto de la actividad bacteriana en el suelo en ecosistemas oligotróficos: una revisión crítica. Terra Latinoamericana 31(3): 231-242
- Tanyol M, Uslu G, Yönten V (2015) Optimization of lipase production on agro-industrial residue medium by *Pseudomonas fluorescens* (NRLL B-2641) using response surface methodology. Biotechnol Biotechnol Equip 29(1): 64-71
- van Keulen G, Siebring J, Dijkhuizen L (2011) Central Carbon Metabolic Pathways in *Streptomyces*. En: Dyson P (Ed). *Streptomyces: Molecular Biology and Biotechnology*, pp. 105-124. Caister Academic Press, Norfolk
- Wang J, Wan W (2009) Experimental design methods for fermentative hydrogen production: A review. International Journal of Hydrogen Energy 34: 235-244
- Xiong ZQ, Tu XR, Tu GQ (2008) Optimization of medium composition for actinomycin X2 production by *Streptomyces* spp JAU4234 using response surface methodology. J Ind Microbiol Biotechnol 35(7): 729-734; doi: 10.1007/s10295-008-0339-4
- Zhu J, Li M, Whelan M (2018) Phosphorus activators contribute to legacy phosphorus availability in agricultural soils: A review. Science of the Total Environment 612: 522–537

Recibido: 18-10-2018

Aceptado: 07-01-2019

Este es un artículo de acceso abierto distribuido bajo una Licencia Creative Commons Atribución-NoComercial 4.0 Internacional (CC BY-NC 4.0) <https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/> Está permitido su uso, distribución o reproducción citando la fuente original y autores.