



**BENEMÉRITA
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE PUEBLA**



INSTITUTO DE CIENCIAS

CENTRO DE INVESTIGACIONES EN CIENCIAS MICROBIOLÓGICAS

**ESCALAMIENTO Y ESTRATEGIAS DE CO-CULTIVO PARA
LA PRODUCCIÓN DE UN INOCULANTE DE SEGUNDA
GENERACIÓN**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRA EN CIENCIAS (MICROBIOLOGÍA)
CON OPCIÓN EN: BIOQUÍMICA Y GENÉTICA MICROBIANA

PRESENTA:

I.B.Q. MARISOL HERNÁNDEZ VARGAS

DIRECTOR DE TESIS:

D.C. ANTONINO BAEZ ROGELIO

PUEBLA, PUE.

DICIEMBRE 2017



BUAP

Puebla, Pue. a 11 de diciembre 2017.

**A LA ACADEMIA DEL POSGRADO
EN MICROBIOLOGÍA
CICM-ICUAP
PRESENTE.**


Por este conducto los abajo firmantes, integrantes del Comité revisor de Tesis de Maestría de la alumna **Marisol Hernández Vargas**, les informamos que hemos revisado el escrito titulado:

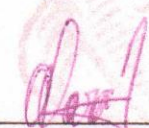
“Escalamiento y estrategias de co-cultivo para la producción de un inoculante de segunda generación”


A nuestro juicio, la alumna **Marisol Hernández Vargas** puede proceder a la impresión de la tesis y a la presentación del examen de grado correspondiente.

Sin más que agregar, nos despedimos afectuosamente de ustedes.

Atentamente.
“Pensar Bien Para Vivir Mejor”


D.C. Yolanda Elizabeth Morales García


D.C. Álvaro Raúl Lara Rodríguez


D.C. Jesús Muñoz Rojas


D.C. Alma Rosa Netzahuatl Muñoz

Dedicatoria

*A ti Padre Celestial, que nunca me has dejado sola,
porque he aprendido que todo lo que se hace es
gracias a ti y para ti.*

*A mi padre, porque hasta su último suspiro me
enseñó lo que es la fortaleza.*

*A mi madre, que me ha enseñado lo que es la
paciencia, el amor y la fe a Dios.*

*A mis 5 hermanos, que me han enseñado los que es
la unidad y el apoyo familiar.*

Agradecimientos.

Este proyecto se desarrolló en el Laboratorio de Ecología Molecular Microbiana dentro del Centro de Investigaciones en Ciencias Microbiológicas, del Instituto de Ciencias de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla.

El desarrollo de este proyecto contó con el apoyo de la beca número 681902 otorgada por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT).

Se agradece a la Vicerrectoría de Investigación y Estudios de Posgrado de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla (VIEP-BUAP) por el apoyo económico otorgado para la presentación de este trabajo en la ciudad de Denver, Colorado, USA, durante la exhibición anual de la sociedad Industrial de microbiología y biotecnología SIMB, 2017.

Doy gracias a mi asesor, el D.C. Antonino Baez Rogelio, por permitirme ser parte de su equipo de investigación. Mil gracias Dr. Antonino por todo su conocimiento compartido y el apoyo brindado para la culminación de este proyecto a lo largo de estos dos años.

Al D.C. Jesús Muñoz Rojas y la D.C. Yolanda Elizabeth Morales García, por el apoyo recibido como grupo de trabajo en cuanto a materiales, reactivos y lugar de trabajo dentro del Laboratorio de Ecología Molecular Microbiana.

Al resto de mi comité revisor: D.C. Álvaro Raúl Lara Rodríguez y la D.C. Alma Rosa Netzahuatl Muñoz, por todo el apoyo recibido durante las revisiones de la tesis.

A la D.C. Verónica Quintero Hernández, por todo su apoyo y delicadeza hacia mi persona.

A mis compañeros de generación 2015 - 2017 por todos los momentos compartidos durante nuestra estancia en este centro de investigación, y a los dos norteños porque fuimos una familia por dos años.

A los chicos malos del laboratorio, porque además de ser compañeros del grupo de laboratorio, somos y seguiremos siendo grandes amigos, América, Lilia, Lesther, Raúl, Abisai, Teo, Daniel, Marisol Cervantes.

A mis excompañeros de trabajo y a aquellos amigos que me dieron palabras de aliento y me hicieron creer en mí cuando pasó mi momento de flaqueza: Verónica Méndez, Richard, Dulce, América, Lilia, Lupita.

Gracias linda familia, porque siempre han estado conmigo apoyándome en todo lo que realizo, estén o no de acuerdo.

ÍNDICE

1. Resumen	11
2. Introducción	12
3. Marco teórico	13
3.1 Rizobacterias y bacterias promotoras del crecimiento de plantas (PGPR y PGPB) ...	13
3.2 Inoculantes microbianos	14
3.3 Inoculantes de segunda generación	15
3.4 Inoculante multi-especies EMMIM-1	15
3.4.1 <i>Azospirillum brasilense</i>	16
3.4.2 <i>Pseudomonas putida</i>	16
3.4.3 <i>Sphingomonas</i> sp.	17
3.4.4 <i>Burkholderia unamae</i>	17
3.4.5 <i>Gluconacetobacter diazotrophicus</i>	18
3.4.6 <i>Bradyrhizobium</i> sp.	18
3.5 Estrategia de producción actual del inoculante EMMIM-1	19
3.6 Escalamiento de inoculantes de caja Petri a biorreactor	19
3.7 Co-cultivos como una estrategia para abatir costos de producción	20
3.8 Parámetros de calidad para la formulación de inoculantes	21
4. Antecedentes	22
5. Justificación	23
6. Hipótesis	23
7. Objetivos	24
7.1 Objetivo general.....	24
7.2 Objetivos particulares	24
8. Materiales y métodos	25
8.1 Cepas bacterianas.....	25
8.2 Medios de cultivo.....	25
8.2.1 Medios de cultivo selectivos.....	22
8.2.2 Medios de cultivo seleccionados a partir de la literatura.....	25
8.3 Caracterización del crecimiento en cultivos sumergidos	26
8.3.1 Caracterización en matraces agitados	26
8.3.2 Caracterización de las cinéticas de crecimiento en biorreactores (cultivos individuales).....	27
8.3.3 Caracterización molecular	28
8.3.4 Caracterización de las cinéticas de crecimiento en biorreactores (co-cultivos)	28
8.4 Cuantificación de sacarosa: Hidrólisis ácida - DNS	29
8.5 Análisis de metabolitos mediante HPLC	29
9. Resultados y discusión	30
9.1 Selección de los medios de cultivo para la propagación masiva de cada una de las especies bacterianas	30
9.1.1 Caracterización de las curvas de crecimiento en matraces agitados.....	31
9.2 Establecer/desarrollar el proceso de producción en biorreactores y caracterización de la cinética de crecimiento de cada especie	37
9.2.1 Caracterización de la curva de crecimiento de <i>Sphingomonas</i> sp. OF178	37

9.2.1.1	Identificación molecular y fenotípica de <i>Sphingomonas</i> sp. OF178 en muestras de fermentación.....	38
9.2.2	Caracterización de la curva de crecimiento de <i>Azospirillum brasilense</i> Sp7 ..	39
9.2.2.1	Identificación molecular y fenotípica de <i>Azospirillum brasilense</i> Sp7 en muestras de fermentación.....	40
9.2.3	Caracterización del crecimiento de <i>Pseudomonas putida</i> KT2440	40
9.2.3.1	Identificación molecular y fenotípica de <i>Pseudomonas putida</i> KT2440 en muestras de fermentación	41
9.2.4	Caracterización de la curva de crecimiento de <i>Bradyrhizobium</i> sp MS22	42
9.2.5	Caracterización de la curva de crecimiento de <i>Burkholderia unamae</i> MTI 641 ^T	43
9.2.5.1	Identificación molecular y fenotípica de <i>Burkholderia unamae</i> MTI 641 ^T en muestras de fermentación	44
9.2.6	Caracterización del crecimiento de <i>Gluconacetobacter diazotrophicus</i> PAL5 ^T	45
9.2.6.1	Identificación molecular y fenotípica de <i>Gluconacetobacter diazotrophicus</i> PAL5 ^T en muestras de fermentación	46
9.3	Evaluación de ácido succínico como fuente de carbono alternativa para co-inoculaciones	47
9.3.1	Caracterización del crecimiento de <i>B. unamae</i> MTI 641 ^T , <i>P. putida</i> KT2440 y <i>A. brasilense</i> Sp7 en matraces agitados con ácido succínico	48
9.3.2	Caracterización del crecimiento de <i>B. unamae</i> MTI 641 ^T , <i>P. putida</i> KT2440 y <i>A. brasilense</i> Sp7 en biorreactor con ácido succínico	50
9.4	Co-cultivos en biorreactor utilizando dos fuentes de carbono para disminuir la competencia por un mismo sustrato	51
9.4.1	Caracterización del crecimiento de <i>Azospirillum brasilense</i> Sp7 y <i>Bradyrhizobium</i> sp. MS22 en biorreactor con ácido succínico y sacarosa.....	52
9.4.2	Caracterización del crecimiento <i>Sphingomonas</i> sp. OF178 y <i>Pseudomonas putida</i> KT2440 en biorreactor con ácido succínico y sacarosa	54
9.4.3	Caracterización del crecimiento de <i>Gluconacetobacter diazotrophicus</i> PAL5 ^T y <i>Burkholderia unamae</i> MTI 641 ^T en biorreactor con ácido succínico y sacarosa ..	56
9.5	Evaluación de co-inoculaciones de tres bacterias con sacarosa como fuente de carbono	57
9.5.1	Caracterización del crecimiento de tres bacterias en matraces agitados	57
9.5.2	Caracterización en biorreactor	60
9.5.2.1	Caracterización del crecimiento de <i>A. brasilense</i> Sp7, <i>Sphingomonas</i> sp. OF178 y <i>P. putida</i> KT2440 en co-cultivo en biorreactor.....	60
9.5.2.2	Caracterización del crecimiento de <i>G. diazotrophicus</i> PAL5 ^T , <i>B. unamae</i> MTI 641 ^T y <i>Bradyrhizobium</i> sp. MS22 en co-cultivo en biorreactor	62
9.6	Análisis de metabolitos producidos por las bacterias utilizando cromatografía líquida (HPLC)	64
9.6.1	Comparación de metabolitos producidos en co-inoculación vs. Individual de <i>G. diazotrophicus</i> PAL5 ^T , <i>B. unamae</i> MTI 641 ^T y <i>Bradyrhizobium</i> sp. MS22	64
9.6.2	Comparación de metabolitos producidos en co-inoculación vs. Individual de <i>A. brasilense</i> Sp7, <i>Sphingomonas</i> sp. OF178 y <i>P. putida</i> KT2440	67
10.	Conclusión	67

11. Bibliografía.....	68
12. Anexos.....	75

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1	Evaluación del crecimiento de <i>Bradyrhizobium</i> sp. MS22, <i>Sphingomonas</i> sp. OF178 y <i>P. putida</i> KT2440 en los medios de cultivo en matraces agitados	32
Figura 2	Evaluación del crecimiento de <i>G. diazotrophicus</i> PAL5 ^T , <i>B. unamae</i> MTI 641 ^T y <i>A. brasilense</i> Sp7 en los medios de cultivo en matraces agitados.....	34
Figura 3	Curva de crecimiento de <i>Sphingomonas</i> sp. OF178 en biorreactor.....	37
Figura 3.1	Amplificación del gen que codifica para el 16S RNAr de <i>Sphingomonas</i> sp. OF178	38
Figura 3.2	Pesos moleculares (control positivo bacterias EMMIM-1)	38
Figura 3.3	Identificación morfológica de OF178	39
Figura 4	Curva de crecimiento de <i>Azospirillum brasilense</i> Sp7 en biorreactor	39
Figura 4.1	Amplificación <i>laf1</i> de <i>Azospirillum brasilense</i> Sp7	41
Figura 4.2	Pesos moleculares (control positivo bacterias EMMIM-1)	41
Figura 4.3	Identificación morfológica de Sp7	41
Figura 5	Curva de crecimiento de <i>Pseudomonas putida</i> KT2440 en biorreactor	41
Figura 5.1	Amplificación del gen que codifica para <i>fliM</i> de <i>Pseudomonas putida</i> KT2440	42
Figura 5.2	Identificación morfológica de <i>P. putida</i> KT2440	42
Figura 6	Curva de crecimiento de <i>Bradyrhizobium</i> sp. MS22 en biorreactor.....	43
Figura 6.1	Identificación morfológica de <i>Bradyrhizobium</i> sp. MS22.....	43
Figura 7	Curva de crecimiento de <i>Burkholderia unamae</i> MTI 641 ^T en biorreactor ...	44
Figura 7.1	Identificación molecular de <i>B. unamae</i> MT1 641 ^T	45
Figura 7.2	Identificación morfológica de <i>B. unamae</i> MT1 641 ^T	46
Figura 8	Curva de crecimiento de <i>Gluconacetobacter diazotrophicus</i> PAL5 ^T	46
Figura 8.1	Identificación molecular del gen que codifica para <i>adh-pqq</i> de PAL5 ^T	47
Figura 8.2	Identificación morfológica de <i>G. diazotrophicus</i> PAL5 ^T	47
Figura 9	Curvas de crecimiento de la caracterización con ácido succínico para <i>B. unamae</i> MTI 641 ^T , <i>Azospirillum brasilense</i> Sp7 y <i>Pseudomonas putida</i> KT2440 en matraces agitados	49
Figura 10	Curvas de crecimiento de la caracterización con ácido succínico para <i>B. unamae</i> MTI 641 ^T , <i>Azospirillum brasilense</i> Sp7 y <i>Pseudomonas putida</i> KT2440 en biorreactor	51
Figura 11	Curvas de crecimiento de la co-inoculación de <i>Bradyrhizobium</i> sp. MS22 y <i>Azospirillum brasilense</i> Sp7 en biorreactor	53
Figura 11.1	Caracterización molecular de la co-inoculación de <i>Bradyrhizobium</i> sp. MS22 y <i>Azospirillum brasilense</i> Sp7.....	54
Figura 11.2	Caracterización morfológica de la co-inoculación de <i>Bradyrhizobium</i> sp. MS22 y <i>Azospirillum brasilense</i> Sp7.....	54
Figura 12	Curva de crecimiento de la co-inoculación de <i>Sphingomonas</i> sp. OF178 y <i>Pseudomonas putida</i> KT2440 en biorreactor.....	55

Figura 12.1	Caracterización molecular de la co-inoculación de <i>Sphingomonas</i> sp. OF178 y <i>Pseudomonas putida</i> KT2440	56
Figura 12.2	Caracterización morfológica de la co-inoculación de <i>Sphingomonas</i> sp. OF178 y <i>Pseudomonas putida</i> KT2440	56
Figura 13	Curva de crecimiento de la co-inoculación de <i>Gluconacetobacter diazotrophicus</i> PAL5 ^T y <i>Burkholderia unamae</i> MTI 641 ^T en biorreactor....	57
Figura 13.1	Caracterización morfológica de la co-inoculación de <i>Gluconacetobacter diazotrophicus</i> PAL5 ^T y <i>Burkholderia unamae</i> MTI 641 ^T	59
Figura 14	Curvas de crecimiento de la co-inoculación de tres bacterias: <i>Gluconacetobacter diazotrophicus</i> PAL5 ^T , <i>Burkholderia unamae</i> MTI 641 ^T y <i>Bradyrhizobium</i> sp. MS22; <i>Azospirillum brasilense</i> Sp7, <i>Pseudomonas putida</i> KT2440 y <i>Sphingomonas</i> sp. OF178 en matraces agitados.	61
Figura 15	Curvas de crecimiento de la co-inoculación de <i>Azospirillum brasilense</i> Sp7, <i>Pseudomonas putida</i> KT2440 y <i>Sphingomonas</i> sp. OF178 en biorreactor. .	61
Figura 15.1	Caracterización molecular de la co-inoculación de <i>Azospirillum brasilense</i> Sp7, <i>Pseudomonas putida</i> KT2440 y <i>Sphingomonas</i> sp. OF178.....	61
Figura 15.2	Caracterización morfológica de la co-inoculación de <i>Azospirillum brasilense</i> Sp7, <i>Pseudomonas putida</i> KT2440 y <i>Sphingomonas</i> sp. OF178	63
Figura 16	Curva de crecimiento de la co-inoculación de <i>Gluconacetobacter diazotrophicus</i> PAL5 ^T , <i>Burkholderia unamae</i> MTI 641 ^T y <i>Bradyrhizobium</i> sp. MS22. en biorreactor	63
Figura 16.1	Caracterización molecular de la co-inoculación de <i>Gluconacetobacter diazotrophicus</i> PAL5 ^T , <i>Burkholderia unamae</i> MTI 641 ^T y <i>Bradyrhizobium</i> sp. MS22.	63
Figura 16.2	Caracterización morfológica de la co-inoculación de <i>Gluconacetobacter diazotrophicus</i> PAL5 ^T , <i>Burkholderia unamae</i> MTI 641 ^T y <i>Bradyrhizobium</i> sp. MS22.	65
Figura 17	Cromatogramas comparativos de la co-inoculación de <i>Gluconacetobacter diazotrophicus</i> PAL5 ^T , <i>Burkholderia unamae</i> MTI 641 ^T y <i>Bradyrhizobium</i> sp. MS22 vs. Individual:	66
Figura 18	Cromatogramas comparativos de la co-inoculación de <i>Azospirillum brasilense</i> Sp7, <i>Pseudomonas putida</i> KT2440 y <i>Sphingomonas</i> sp. OF178 vs. Individual:.....	59

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1	Cepas microbianas que conforman el inoculante, tiempos de crecimiento y medios selectivos	25
Tabla 2	Productividades de los medios evaluados	36
Tabla 3	Productividades obtenidas en cultivos individuales en biorreactor	47
Tabla 4	Productividades obtenidas en ácido succínico en matraces	49
Tabla 5	Productividades obtenidas en biorreactor con ácido succínico.....	51

ÍNDICE DE ANEXOS

Figura 19	Crecimiento no detectado de <i>Gluconacetobacter diazotrophicus</i> PAL5 ^T en LB modificado	75
Figura 20	Crecimiento en placa Petri de <i>Gluconacetobacter diazotrophicus</i> PAL5 ^T en LGI y medio de producción	75
Figura 21	Crecimiento no detectado de <i>Burkholderia unamae</i> MTI 641 ^T en LB modificado	76
Figura 22	Formación de espuma de la hora 5 y 6 de <i>Pseudomonas putida</i> KT2440 en biorreactor	76
Tabla 6	Caracterización del crecimiento de la co-inoculación de <i>Azospirillum brasilense</i> Sp7 y <i>Bradyrhizobium</i> sp. MS22 en matraz con diferentes condiciones.....	78
Tabla 7	Caracterización del crecimiento de la co-inoculación de <i>Pseudomonas putida</i> KT2440 y <i>Sphingomonas</i> sp. OF178 en matraz con diferentes condiciones	79
Tabla 8	Caracterización del crecimiento de co-inoculaciones al mismo tiempo de <i>Pseudomonas putida</i> KT2440 y <i>Sphingomonas</i> sp. OF178; <i>Azospirillum brasilense</i> Sp7 y <i>Bradyrhizobium</i> sp. MS22 con sacarosa como fuente de carbono	80
Tabla 9	Curvas patrón de sacarosa en g/L de cultivos individuales y co-cultivos de dos y tres bacterias	81
Cromatograma	Estándar Bio-Rad	82
Cromatogramas	Cultivos individuales.....	83
Cromatogramas	Co-cultivos	85

1. RESUMEN.

Los efectos adversos ocasionados por la tecnología de la revolución verde ha propiciado la búsqueda de alternativas sostenibles con la finalidad de mitigar los daños ambientales ocasionados por el uso indiscriminado de pesticidas, herbicidas y fertilizantes nitrogenados. El empleo de bacterias benéficas que promueven el desarrollo de plantas es una alternativa ecológica y económicamente factible. Aunque la inoculación de semillas y suelos con bacterias promotoras del crecimiento de plantas (PGPB) no es reciente, su aceptación en el mercado ha sido limitada por su variable efectividad. Es necesario desarrollar tecnologías de proceso para la producción masiva de inoculantes de alta calidad que aseguren en las formulaciones la presencia de las bacterias de interés en los números y viabilidad deseados. Los inoculantes de segunda generación son formulaciones de dos o más bacterias benéficas que promueven un mayor crecimiento de plantas en comparación con los inoculantes mono-especie. En este trabajo se desarrolló un proceso en biorreactor para la producción de un inoculante multi-especies mediante estrategias de co-cultivos. El inoculante multi-especies EMMIM-1 comprende seis géneros bacterianos con características distintas para la promoción de crecimiento como lo es fijación biológica de nitrógeno, solubilización de fosfatos, producción de hormonas de crecimiento (mecanismos directos), y protección contra plagas (mecanismos indirectos). Para abatir los costos de producción del inoculante multi-especies es necesario reducir el número de corridas de fermentación. Los resultados de este trabajo sugieren el empleo de dos corridas de fermentación mediante co-cultivos de tres bacterias a pH de 7.0 y otra a pH de 5.5, utilizando un solo medio de cultivo. Además, se estableció una metodología mediante herramientas moleculares y fenotípicas para detectar y cuantificar al final de la fermentación la presencia de las bacterias de interés. Lo anterior nos permitió asegurar que el inoculante producido estaba libre de microorganismos contaminantes, requisito de calidad fundamental para la futura producción masiva del inoculante EMMIM-1.

2. INTRODUCCIÓN.

Con el objetivo de satisfacer las necesidades alimenticias de la población mundial, es necesario desarrollar sistemas de producción agrícola sostenibles (Reddy *et al.* 2013). Para 2030 se estima un incremento del 40% en la demanda mundial de alimentos y se presume un crecimiento poblacional global del 25% para el año 2050 (Schroeder *et al.*, 2013), por lo que la producción agrícola tendrá que aumentar al menos un 70% para ese año (Reddy *et al.*, 2013). Una de las estrategias más utilizadas de la tecnología de la revolución verde ha sido la aplicación de fertilizantes químicos y plaguicidas (Baez-Rogelio *et al.*, 2017; Serrat 2004), lo cual ayudó en su momento a incrementar los rendimientos de la producción agrícola. Sin embargo, su producción es insostenible ya que se consume el 1% de la energía mundial para su obtención. Así mismo, los fertilizantes nitrogenados son el insumo más costoso (Schroeder *et al.*, 2013) y pueden representar hasta el 50% del costo total de la producción agrícola (Gutiérrez 2012). Además es un insumo altamente contaminante ya que solo entre 30 y 50% de la cantidad total de fertilizante aplicada es utilizado por la planta, el resto se incorpora al medio ambiente donde produce eutrofización en ríos y océanos, así como gases de tipo invernadero (Wang *et al.*, 2012; Vassilev *et al.*, 2015). Debido a los efectos adversos ocasionados durante la revolución verde, los agricultores de todo el mundo han buscado alternativas de producción de alimentos sostenibles, basadas en experiencias pasadas de la agricultura orgánica. Muchos grupos investigan la utilización de inoculantes y agentes biológicos que permitan el reemplazo de fertilizantes nitrogenados y otros agro-químicos (Baez-Rogelio *et al.*, 2017; Bashan 2014, 1998).

3. MARCO TEORICO.

3.1 Rizobacterias y Bacterias promotoras del crecimiento de plantas (PGPR y PGPB).

Algunas bacterias afectan el crecimiento de plantas de forma positiva. Algunas de estas bacterias se encuentran en la rizósfera (Trivedi *et al.*, 2012; Vanegas y Uribe-vélez 2014), definida como el área del suelo influenciada por los exudados de la raíz (Molina-Romero *et al.*, 2015). Las bacterias de la rizósfera pueden ser de tipo simbiótico, mutualista o de vida libre en función de sus capacidades de colonización y coexistencia con la planta. Las *rizobias* son bacterias que interactúan con las raíces de plantas simbióticamente, internalizándose y formando nódulos en la raíz, mecanismo por el cual son capaces de fijar nitrógeno atmosférico dejándolo biodisponible a la planta (Serrat 2004). Algunos ejemplos de géneros bacterianos de vida libre que viven en los alrededores de la raíz y suministran a la planta compuestos como hormonas de crecimiento, solubilizan los minerales o producen enzimas líticas son *Azotobacter*, *Clostridium*, *Herbaspirillum*, y *Burkholderia* (Vanegas y Uribe-vélez 2014). Las cepas bacterianas del género *Azospirillum* son de vida libre y podrían internalizarse en las raíces de las plantas hasta el córtex (Bashan 1998; Kennedy *et al.*, 2004; Reddy *et al.*, 2013;).

Los mecanismos de promoción de crecimiento de plantas pueden ser directos e indirectos. Los mecanismos directos de promoción de crecimiento incluyen la fijación biológica de nitrógeno (donde la enzima nitrogenasa convierte el N_2 en NH_4^+), aumento de la disponibilidad de nutrientes (biosolubilización de minerales como fosfatos mediante fosfatasas, fitasas, fisfonatasas) y la producción de fitohormonas (ácido-indol-acético, citocinas, giberelinas). Los mecanismos indirectos incluyen la protección contra plagas (mecanismo de biocontrol) mediante la producción de compuestos volátiles, compuestos antimicrobianos, producción de enzimas líticas (quitinasas, proteasas) o sideróforos (Molina-Romero *et al.*, 2015). Las bacterias pueden utilizar más de un mecanismo por lo que la promoción de crecimiento varía entre bacterias del mismo género (Glick, 2015). Las bacterias también se benefician de los exudados de las plantas para su desarrollo fisiológico debido a que las plantas excretan sustancias como azúcares, compuestos fenólicos, amino

ácidos, ácidos orgánicos, compuestos de bajo peso molecular como los polisacáridos y proteínas; por otro lado, algunas veces los exudados contienen antibióticos que llegan a inhibir bacterias, hongos y diversos compuestos bioactivos (Glick, 2015).

3.2 Inoculantes microbianos.

Los inoculantes microbianos son formulaciones que contienen uno o más microorganismos contenidos en un acarreador cuya función del acarreador es el de mantener viables a los microorganismos desde el sitio donde son producidos hasta el sitio donde son aplicados. Las aplicaciones son variables en función del tipo de microorganismos que contiene el inoculante, por ejemplo pueden ser promotores del crecimiento de plantas, biorremediadores, biocontroladores, entre otras funciones (Brockwell y Bottomley 1995; Rebah *et al.*, 2007; Reddy *et al.*, 2013;). El desarrollo de tecnología para la formulación de inoculantes a base de rizobios que promueven el crecimiento en plantas y su uso en la agricultura data desde hace un siglo. El empleo de inoculantes con bacterias no simbióticas asociadas a la rizósfera como aquellos que llevan cepas del género *Azotobacter* fueron usados en gran escala entre los años de 1930 a 1940. Para 1970 se iniciaron estudios de la inoculación con *Azospirillum* y los agentes de biocontrol como *Pseudomonas fluorescens* y *p. putida*. En los últimos años se han utilizado bacterias de vida libre (*Azospirillum*, *Pseudomonas*, *Azotobacter*, etc.) y otros simbiontes de plantas (*Gluconacetobacter*) para la formulación de inoculantes (Bashan 2014, 1998). La mayoría de los bio-inoculantes usados en 2012 fueron basados en *Rhizobium*, constituyendo el 79% de la demanda global, el 15% fue para bio-inoculantes que movilizan fósforo y un 7% para productos de micorriza (Owen *et al.*, 2014). Aunque la inoculación de plantas con bacterias benéficas ha sido practicada desde hace más de 100 años en el mundo (Bashan 1998), y más de cuatro décadas en México (Armenta-Bojórquez *et al.*, 2010), el desarrollo de tecnologías de producción, formulación y almacenamiento que aseguren una alta viabilidad y efectividad de los inoculantes microbianos sigue siendo una limitante para su comercialización (John *et al.*, 2011). Por esta razón, muchas de las bacterias benéficas reportadas en la literatura científica, nunca llegan a culminar como un producto en el mercado (Bashan 2014, 1998).

3.3 Inoculantes de segunda generación.

Existen en el mercado nacional algunos inoculantes con base en *Azospirillum brasilense*, *Rhizobium etli.*, y *Glomus intraradices* dirigidos a la producción de granos y leguminosas, todos ellos formulaciones de una sola especie de microorganismo. Aunque en la literatura se cita a un gran número de bacterias con características PGPR / PGPB, no siempre esos microorganismos resultan exitosos en cultivos de campo, por tal motivo desde hace algunos años se han estado estudiando formulaciones que comprenden consorcios microbianos. Los inoculantes de segunda generación son formulaciones que contienen en su composición más de una bacteria del mismo o diferente género (Baez-Rogelio *et al.*, 2017; Vivanco-Calixto *et al.*, 2016). Este tipo de formulaciones promete ser beneficiosa para diferentes cultivos agrícolas ya que al inocular semillas con diferentes cepas bacterianas existe mayor sinergismo por lo que se incrementa la promoción de crecimiento y se reduce la incidencia de enfermedades en cultivos (Molina-Romero, *et al.*, 2017). Las interacciones sinérgicas de los microorganismos aumentan la disponibilidad de nutrientes minerales, eliminan compuestos inhibitorios que pudieran estar afectando el desarrollo de la planta, y estimulan mayores actividades físicas o bioquímicas que potencien aspectos fisiológicos. Algunos ejemplos de consorcios microbianos evaluados son la co-inoculación de maní con *Azospirillum* Az39 y *Bradyrhizobium* 15A, en donde se vio incrementada la nodulación y productividad (Vicario *et al.*, 2015), la co-inoculación de *Azospirillum* Cd y *Burkholderia unamae* MTI 641^T en maíz, en donde se incrementó la actividad fotosintética indicando un efecto positivo en el proceso de fotosíntesis debido a la interacción planta-bacteria (Gordillo-Delgado, Marín, y Calderón 2016) y recientemente Molina-Romero *et al.*, (2017) evaluaron cuatro cepas (*Azospirillum brasilense* Sp7, *Sphingomonas* sp OF178, *Pseudomonas putida* KT2440 y *Acinetobacter* sp EMM02) en plantas de maíz en donde se vio incrementado el peso seco del tallo y raíz, la altura y diámetro de la planta.

3.4 Inoculante multi-especies EMMIM-1.

En el Laboratorio de Ecología Molecular Microbiana se han desarrollado formulaciones de inoculantes de segunda generación, entre los que destaca el EMMIM-1, cuya estimulación en el crecimiento y producción de maíz resulta superior a la inoculación con una sola especie

(Morales-García *et al.*, 2012). La superioridad del desempeño del multi-inoculante fue demostrada tanto en condiciones de invernadero como de campo. Los géneros bacterianos que comprende este inoculante polimicrobiano se describen a continuación:

3.4.1 *Azospirillum brasilense*.

Azospirillum brasilense es una bacteria diazotrófica, Gram negativa de vida libre, microaeróbica, pertenece al grupo α -proteobacteria, aislada de cultivos de maíz por Dobereiner. Es una de las bacterias más estudiadas entre las denominadas PGPB (Bashan 1998; Bashan y Holguin 1998). Se le ha atribuido la capacidad de promoción de crecimiento en plantas y el incremento de resistencia a factores bióticos y abióticos mediante la producción de fitohormonas, así como la inducción a la resistencia sistémica de la planta (Cassán 2016; Creus y Issues 2015; Fukami *et al.*, 2016; Glick, *et al.*, 1999; Reis *et al.*, 2015). De acuerdo a Cassán (2016), su capacidad de promoción de crecimiento en plantas se debe primordialmente a la producción de auxinas como el ácido-indol-acético (AIA), seguido de la producción de óxido nítrico (NO), citoquininas, giberelinas, producción de etileno, ácido abscísico (ABA) y poliaminas (espermidina, espermina, diamina, cadaverina).

3.4.2 *Pseudomonas putida*.

El género *Pseudomonas* pertenece a la clase gama proteobacteria. Son bacterias aeróbicas, móviles, Gram negativas, quimiorganótrofas. Las bacterias de este género tienen la capacidad de crecer en presencia de compuestos aromáticos (García-Valdés y Lalucat 2016). Son bacterias ubicuas ya que se han aislado de diferentes ambientes como suelos, agua, animales, plantas y muestras clínicas. Estas bacterias son importantes en la agricultura debido a que controlan fitopatógenos, potencian el desarrollo de plantas y son importantes para biorremediación porque degradan compuestos xenobióticos, siendo la bacteria más estudiada *Pseudomonas putida* (Belda *et al.*, 2016; Molina-Romero *et al.*, 2017; Nelson *et al.*, 2002;). *Pseudomonas* produce antibióticos, y aunque para la mayoría de ellos se desconocen los mecanismos de acción, el antibiótico más estudiado es el DAPG (2-4 diacetilfloroglucinol) que inhibe el crecimiento de hongos (Someya *et al.*, 2013).

3.4.3 *Sphingomonas* sp.

Las bacterias pertenecientes a este grupo son bacilos Gram negativos no esporulados, forman colonias de pigmento amarillo o blanco marrón de 0.1 -2 μm de diámetro; son estrictamente aeróbicas con metabolismo quimioheterotrófico. Este grupo fue propuesto por Yabuuchi *et al.*, (1990). Las bacterias son móviles; tienen un flagelo polar, subpolar o peritrico, producen catalasa, pertenecen al grupo α -proteobacteria y también producen carotenoides (Glaeser y Kämpfer 2014; Kim *et al.*, 2014;). Crecen en un intervalo de temperatura entre 15 y 28 °C en un rango de pH que va de 4 a 12, siendo el pH óptimo de crecimiento entre 6.5-7.0. Una característica importante es que contienen esfingolípidos en lugar de lipopolisacáridos en su pared celular. Se han aislado de veterinarias clínicas, superficies de humidificadores, contaminantes de laboratorios (Glaeser y Kämpfer 2014), se encuentran distribuidas en el suelo, agua y sedimentos; poseen la capacidad de degradar hidrocarburos poliaromáticos.

3.4.4 *Burkholderia unamae*.

Las bacterias de este género son bacilos rectos Gram negativos, no fermentativos, catalasa y oxidasa positivos, son móviles con un flagelo polar o algunas otras con penacho de flagelos, pertenecientes a la clase β -proteobacteria. Crecen en temperaturas que van desde los 29 a 37°C y en pH de 4.5 a 6.5. Desde 1992 se han descrito alrededor de 80 a 100 especies (Estrada-de los Santos *et al.*, 2016; Depoorter *et al.*, 2016). Es una bacteria de alta importancia biotecnológica ya que son útiles en el desarrollo de plantas (fijación de nitrógeno), biorremediación (degradan compuestos tóxicos) y biocontrol (sintetizan compuestos antimicrobianos: pirrolnitrina, xilocandinas, cepalunginas, fenacinas, derivados de quinacina entre otros), (Liu y Cheng 2014). Este género está presente en diversos ambientes, algunas son consideradas patógenas para plantas y humanos; sin embargo, el mayor número de estas bacterias son de importancia agrícola, razón por la cual se ha dividido en patógenas de plantas-animales y en bacterias que son benéficas a plantas y al medio ambiente, las que recientemente se han agrupado en un nuevo género con el nombre de *Paraburkholderia* (Sawana *et al.*, 2014).

3.4.5 *Gluconacetobacter diazotrophicus*.

Las bacterias pertenecientes a este género son bacilos Gram negativos, endófitos, diazotróficos localizados preferentemente en el xilema de plantas. Son organismos capaces de crecer en fuentes de carbono como sacarosa, glucosa, fructosa, gluconato, manitol, sorbitol, o glicerol. No posee la habilidad de utilizar ácidos carboxílicos como succinato, fumarato o malato (Sarkar *et al.*, 2010). Se aisló por primera vez de tejidos de caña de azúcar en 1988, sin embargo se encuentra presente en cultivos de camote, café, piña, té, plátano y en la chinche harinosa (Muñoz-Rojas, 2005). La importancia biotecnológica de la cepa PAL5 radica en su capacidad de promover el desarrollo de plantas debido a la producción de ácido-indol-acético, sideróforos, compuestos antimicrobianos; además, solubiliza minerales por la producción de ácido glucónico, fija N₂ dentro de la planta, es tolerante a condiciones ácidas pero incapaz de usar nitrato como única fuente de nitrógeno (Boniolo *et al.*, 2009), aunque posee la habilidad de fijar nitrógeno en presencia de amonio con altas concentraciones de azúcar (Bertalan *et al.*, 2009).

3.4.6 *Bradyrhizobium* sp.

Este tipo de rizobacterias son de las más estudiadas y las más utilizadas por los agricultores en cultivos de leguminosas por su habilidad de nodular y fijar N₂ con la ayuda de la enzima nitrogenasa. Son bacterias bacilares, Gram negativas, flageladas y mantienen una relación simbiótica con leguminosas ya que la bacteria le proporciona el nitrógeno necesario a la planta y la planta le otorga ácidos orgánicos que la bacteria utiliza como fuente de carbono (Menéndez, 2014). Son bacterias especie-específica, puesto que interactúan con un número limitado de plantas y no interactúan con otras plantas que no se encuentren en su nicho ecológico (Glick 2015). Producen grandes cantidades de exopolisacáridos que utilizan como barrera de defensa ya que le permite sobrevivir en condiciones adversas, aunque también le sirven como fuente de carbono (York, *et al.*, 1997).

3.5 Estrategia de producción actual del inoculante EMMIM-1.

En el proceso actual de producción, cada bacteria crece en un medio selectivo en medio sólido y posteriormente se re-suspenden en agua para obtener la formulación líquida. Con esta estrategia de producción se han logrado obtener todos los resultados positivos en la promoción de crecimiento en plantas. Dado el éxito obtenido, surgió la necesidad de extender los estudios a mayores extensiones de terreno lo cual ha hecho evidente la necesidad del escalamiento del proceso de producción del multi-inoculante. El proceso actual de producción del multi-inoculante en medios sólidos en placas es adecuado a escala laboratorio pero no es práctico ni económico a escala industrial. La producción de cultivos sumergidos en biorreactores en cambio, es una alternativa escalable, reproducible y adecuada para la propagación masiva de bacterias.

3.6 Escalamiento de inoculantes de caja Petri a biorreactor.

Un biorreactor es un sistema cerrado que permite controlar condiciones como temperatura, pH, concentración de oxígeno disuelto [DO] y velocidad de agitación, provee un ambiente estéril bajo condiciones controladas para el biocatalizador (enzimas, microorganismos o células eucariotas) con el fin de aumentar el rendimiento y productividad (Lidén 2002). El escalamiento implica el traslado de un bioproceso de una escala a otra. En la literatura se definen dos tipos de escalamiento, el ascendente (“Scale-up”) y el descendente (“Scale-down”). El escalamiento ascendente, del cual se basa este trabajo y en particular de cultivos bacterianos, podría definirse como el procedimiento para diseñar y construir un sistema de fermentación de gran escala con base en los resultados de experimentos con equipamiento de pequeña escala (Palomares y Ramírez, 2000). El escalamiento descendente tiene como objetivo emular a escala laboratorio las condiciones que un microorganismo enfrentaría en la escala de producción para generar datos experimentales bajo condiciones que se asemejan a las reales pero sin la necesidad de hacer ensayos a escala de producción, lo cual resultaría muy costoso (Oosterhuis *et al.*, 1985).

El escalamiento de un proceso de fermentación no es una tarea sencilla, requiere predecir las condiciones de operación en la gran escala que aseguren que el desempeño de los cultivos

sea similar a los desarrollados a nivel laboratorio o planta piloto. Para ello se requiere un análisis minucioso de los principales procesos termodinámicos, cinéticos y de transporte, para evitar futuros problemas, en particular aquellos asociados con las deficiencias del mezclado imperantes en los fermentadores de gran escala (Nielsen y Villadsen 2003). Existen varios métodos para realizar el escalado de un biorreactor, el más utilizado en la industria son las reglas heurísticas o de dedo (Luyben, 1993). En dicha metodología se trata de mantener similitud geométrica del biorreactor y las mismas condiciones de proceso en ambas escalas, pero como ese requerimiento es físicamente imposible de satisfacer entonces se elige un parámetro operacional como criterio de escalamiento, el cual se mantendrá constante en ambas escalas. Con el cambio de escala, un parámetro operacional del biorreactor se puede mantener constante mientras que los demás cambiarán inevitablemente debido a limitaciones del mezclado dentro del biorreactor. Tradicionalmente en el escalamiento ascendente se han considerado la potencia volumétrica, el tiempo de mezclado, la velocidad en la punta del impulsor y el número de Reynolds como criterios de escalamiento (Nielsen y Villadsen 2003). Es importante resaltar que las condiciones ambientales en las que crece una bacteria en placa de Petri son totalmente distintas a las que experimentaría dicha bacteria en un cultivo en biorreactor. En el caso de inoculantes microbianos la mayoría son desarrollados en el laboratorio en medios gelificados en cajas de Petri por lo que los criterios antes descritos no pueden ser aplicados. Sin embargo, el escalamiento no sólo involucra consideraciones ingenieriles sino también consideraciones económicas las que incluyen la formulación de nuevos medios de cultivos (Nielsen y Villadsen 2003). En ese sentido, en este trabajo se exploraron distintos medios de cultivo con el fin de encontrar uno que permitiera la propagación de las seis bacterias que constituyen el inoculante con el propósito de abatir los costos de producción.

3.7 Co-cultivos como una estrategia para abatir costos de producción

Generalmente la producción de formulaciones polimicrobianas consiste en realizar cultivos puros por separado, recuperar los microorganismos, secar y mezclar para obtener una formulación con el número de microorganismos viables deseado. El desarrollo de una fermentación en co-cultivo que promueva el crecimiento de los microorganismos en las

proporciones deseadas, podría reducir múltiples operaciones y abatir costos de producción. Existen varios ejemplos en la literatura que han intentado desarrollar bioprocesos con mezclas de dos o más microorganismos para la producción de etanol, proteína unicelular, probióticos y flavonoides (Fu *et al.*, 2009; Jangra *et al.*, 2016; Jones *et al.*, 2016). Sin embargo, el desarrollo de fermentaciones en co-cultivo no es una tarea trivial, se requiere una amplia comprensión de las interacciones que suceden entre las cepas durante el periodo de crecimiento y conocer los cambios poblacionales dentro del biorreactor. En los diversos tipos de hábitat se llevan a cabo diferentes tipos de interacciones que incluyen predación, comensalismo, parasitismo, neutralismo, mutualismo, competencia, entre otros. Debido a lo anterior, algunos sistemas de fermentaciones en co-cultivo fallan en obtener poblaciones microbianas en las proporciones deseadas porque una de las cepas resulta dominante y crece, mientras que las otras permanecen en los mismos números iniciales (Barrette *et al.*, 2000)

3.8 Parámetros de calidad para la formulación inoculantes.

La tecnología de inoculantes que contienen bacterias promotoras del crecimiento vegetal no ha permeado exitosamente en los mercados de los países sub-desarrollados debido a la pobre calidad de las formulaciones (Bashan *et al.* 2014). La formulación de inoculantes es la combinación de un acarreador con la(s) bacteria(s) de interés para proveer un microambiente que proteja y de estabilidad al microorganismo, manteniendo la viabilidad celular. Los parámetros de calidad que se evalúan en los inoculantes son el número de células viables y la ausencia de microorganismos contaminantes al momento de su aplicación en el campo. Para determinar estos parámetros se utilizan medios selectivos en donde morfológica y visualmente se asegura la presencia del microorganismo de interés (Parnell *et al.*, 2016). Además de los medios selectivos se pueden utilizar herramientas moleculares que permiten la identificación de especies microbianas, como lo es la amplificación de genes específicos de la bacteria de interés. La técnica más utilizada es la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) (Tamay de Dios 2013).

4. ANTECEDENTES.

En el grupo de Ecología Molecular Microbiana del Centro de Investigaciones en Ciencias Microbiológicas de la BUAP se ha desarrollado un inoculante multi-especies denominado EMMIM-1, con resultados prometedores en cultivos de maíz, papa, frijol y tomate. El inoculante multi-especies comprende seis especies bacterianas compatibles que a pesar de producir sustancias inhibitorias contra otras especies (incluyendo patógenos de plantas) no se antagonizan entre ellas (Morales-García 2013). Se cuenta con una patente que fue otorgada en 2016 y que respalda el conocimiento generado con este inoculante multi-especies Expediente: MX2013007978 Folio: 29637.

Con todos estos avances, la siguiente etapa para lograr la transferencia tecnológica es el desarrollo de tecnología de proceso para la producción masiva del inoculante multi-especies. En ese sentido, contar con un proceso de producción caracterizado en biorreactor de escala laboratorio es primordial.

5. JUSTIFICACION.

Muchos de los productos biotecnológicos desarrollados en los laboratorios nunca culminan en un producto aprovechable por la sociedad debido a la falta de tecnologías de producción eficientes y efectivas. El desarrollo de un proceso que permita producir a gran escala y bajo costo el inoculante multi-especies será fundamental para su futura comercialización. La propagación de bacterias en un ambiente controlado en un biorreactor permite maximizar la productividad. Sin embargo, el que el multi-inoculante esté constituido por seis especies bacterianas implica un reto adicional al desarrollo del proceso. La estrategia más simple de producción, desde un punto de vista técnico, será realizar seis cultivos en biorreactor, uno para cada especie y al final mezclar las bacterias para generar la formulación deseada. No obstante, esta estrategia no sería la más viable en términos económicos. Una alternativa es realizar co-cultivos de especies bacterianas para disminuir costos de producción, lo cual implicará otros retos técnicos como el encontrar las condiciones y medios adecuados de cultivo para el crecimiento de dos o tres especies bacterias en un solo biorreactor. Así que en la presente propuesta se propone encontrar las condiciones de cultivo en biorreactor que maximicen la producción de cada especie bacteriana. Además realizar la caracterización cinética de cada especie para establecer las condiciones que permitan el co-cultivo en biorreactor.

6. HIPÓTESIS.

Las condiciones y medios de cultivo adecuados permitirán la propagación de dos o tres géneros bacterianos en co-cultivo en biorreactor haciendo más eficiente la futura producción masiva del inoculante multi-especies EMMIM-1 en comparación con la propagación individual de cada especie.

7. OBJETIVOS.

7.1 OBJETIVO GENERAL

Desarrollar estrategias de co-cultivo y escalamiento para la producción masiva del inoculante multi-especies EMMIM-1

7.2 OBJETIVOS PARTICULARES

1. Definir los medios de cultivo que permitan la propagación masiva de cada una de las especies bacterianas que constituyen el inoculante EMMIM-1 en cultivos sumergidos.
2. Establecer/desarrollar el proceso de producción en biorreactor de cada una de las especies del multi-inoculante y caracterizar su cinética de crecimiento.
3. Desarrollar los procesos de producción en co-cultivos en biorreactor y caracterizar la cinética de crecimiento.

8. MATERIALES Y METODOS.

8.1 Cepas bacterianas.

Cada cepa microbiana se resguardó en glicerol al 25% a -20°C. Para ello se realizaron cultivos de cada bacteria en su respectivo medio selectivo, se tomaron 500 µL de medio y 500 µL de glicerol al 50% previamente esterilizado.

Tabla 1: Cepas microbianas que conforman el inoculante, tiempos de crecimiento y medios selectivos. (Molares-García, 2013)

Bacteria	Tiempo de crecimiento	Medio selectivo
<i>Pseudomonas putida</i> KT2440	24 h	LB* (Cm ⁵⁰)
<i>Sphingomonas</i> sp. OF178	24 h	LB 5% (Cm ³⁰ , CTX ³⁰)
<i>Bradyrhizobium</i> sp. MS22	24 h	LB más Azul de bromotimol (Te ³⁰ , AK ³⁰ , Ge ¹⁰)
<i>Burkholderia unamae</i> MT1 641 ^T	36 h	BAc (Cro ³⁰ , Caz ³⁰)
<i>Gluconacetobacter diazotrophicus</i> PAL ^{5T}	48 h	LGI (Caz ³⁰)
<i>Azospirillum brasilense</i> Sp7	48 h	Rojo Congo (CRO ³⁰)

8.2 Medios de cultivo.

8.2.1 Medios de cultivo selectivos.

Los medios de cultivo selectivos y su composición por cada litro de medio de cultivo para cada bacteria son los siguientes: **LB*** (Peptona 10 g, Extracto de levadura 5 g, NaCl 10 g), **LB5%** (Peptona 0.5 g, Extracto de levadura 0.25 g, NaCl 0.5 g), **LB* más azul de bromotimol** (colorante 75mg), **Rojo Congo** (Ac. Succínico 5 g, K₂HPO₄ 0.5 g, MgSO₄ 0.2 g, NaCl 0.1 g, extracto de levadura 0.5 g, FeCl₃ 0.015 g, KOH 4.8 g, colorante rojo congo 75 mg), **LGI** (K₂HPO₄ 0.2g, KH₂PO₄ 0.6 g, MgSO₄*7H₂O 0.2 g, CaCl₂*2H₂O 0.2 g, NaMoO₄*2H₂O 0.01 g, Extracto de levadura 50 mg, azul de bromotimol 75mg), **BAc** (Ac. Succínico 5 g, K₂HPO₄ 0.4 g, KH₂PO₄ 0.4g, MgSO₄ 0.2 g, Extracto de levadura 4.25 g, KOH 2.7 g, azul de bromotimol 75 mg). En el caso de los medios selectivos gelificados que se usaron para el conteo de colonias en cajas de Petri contenían 16 g/L de agar.

8.2.2 Medios de cultivo seleccionados a partir de la literatura.

Se realizó una búsqueda en la literatura de medios de cultivo que se hayan utilizado en biorreactores en altas concentraciones a alguno de los géneros bacterianos que conforman el

inoculante EMMIM-1. Se eligieron dos medios, **LB modificado** (g/L): Peptona 10 g, Extracto de levadura 5 g, NaCl 7.2 g, Sacarosa 20 g (Díaz-saez, Ríos, y Alberto-casas 2013), y un medio que denominamos **Medio de Producción**: Extracto de levadura 10 g, Sacarosa 20 g, MgSO₄ 0.4 g (Ju, Jiang, y Xu 2012; Sun *et al.*, 2015; Mutturi, Sahai y Sharma 2016; Xu *et al.*, 2015). Al medio de producción se le adicionó un sistema buffer para generar dos pH diferentes, pH 7: K₂HPO₄ 0.43 g y KH₂PO₄ 0.53 g, pH 5.5: K₂HPO₄ 0.846 g y KH₂PO₄ 0.022 g

8.3 Caracterización del crecimiento en cultivos sumergidos.

8.3.1 Caracterización en matraces agitados.

Para la caracterización de la cinética de crecimiento se monitoreó el crecimiento mediante diluciones seriadas base 10 para el conteo de colonias en cajas de Petri y mediante mediciones de absorbancia en un espectrofotómetro a una longitud de onda de 600 nm. El crecimiento de cada bacteria en su respectivo medio selectivo (sin agar) se comparó con el crecimiento obtenido en los medios LB Modificado y Medio de Producción. Cada cinética de crecimiento se evaluó por triplicado.

Preparación de pre-inóculos: Se tomaron 50 µL provenientes del stock de glicerol de cada bacteria, se colocaron en una placa Petri con su respectivo medio selectivo, se incubaron a 30 °C a los tiempos estipulados de crecimiento para cada bacteria (24, 36 o 48 h). Una vez terminados los periodos de incubación en placa Petri, se tomó una colonia de la cepa de interés y se colocó en un matraz de 250 mL con 100 mL del medio de cultivo a evaluar, esterilizado previamente (121 °C y 15 libras de presión por 15 min). Posteriormente los matraces se incubaron a 30 °C y 180 rpm, el periodo de incubación de los pre-inóculos fue de 24, 36 y 48 h, dependiendo del tipo de bacteria que estaba siendo evaluada.

Cinética de crecimiento en matraz: Al terminar el periodo de incubación de los pre-inóculos, se realizó la medición de la densidad óptica a 600 nm con el espectrofotómetro Thermo Spectronic Genesys 10 uv, con base en ese dato se calculó el volumen de inóculo necesario

para iniciar los cultivos en matraz a 0.1 OD₆₀₀ nm. En todos los casos se utilizaron matraces de 250 ml con 100 ml del medio líquido a evaluar. Después de inocular los matraces, se tomó una muestra para medir la OD₆₀₀ nm al tiempo 0; a partir de esa h, cada 2 h se midió la densidad óptica hasta las 24, 36 o 48 h, dependiendo de la cepa bacteriana.

Conteo UFC/mL: En los tiempos 0, 6, 12, 16 (ó 18), 24, 36 y 48, se realizaron conteos de UFC/mL. Se realizaron diluciones seriadas de 10^{-(1 a 4)} para t= 0 y 6; 10^{-(1 a 5)} para t= 12; 10^{-(1 a 6)} para t= 16-18; 10^{-(1 a 7)} al igual que para t=24,36 y 4 y se platearon las tres últimas diluciones en cada una de las placas Petri con medio selectivo sólido con su respectivo antibiótico, estas diluciones seriadas se realizaron por triplicado y se platearon cada una por triplicado.

Análisis de datos: Todos los datos se registraron en una hoja Excel y se realizaron las gráficas de las curvas de crecimiento. Se determinaron UFC/mL máximas para realizar la comparación de productividades de los medios de cultivo.

8.3.2 Caracterización de las cinéticas de crecimiento en Biorreactores (cultivos individuales).

En este caso solo se evaluó el medio denominado “Medio de producción”, ya que en este medio se observó crecimiento microbiano de las seis bacterias y con tiempos de fermentación más cortos.

Se utilizó un biorreactor marca Appikon biotechnology de 1 L de volumen nominal operado con 500 mL de medio. Se calibró el sensor de pH con las soluciones buffer 4 y 7. Después de preparar el Medio de Producción al pH requerido para cada bacteria, se esterilizó a 121 °C y 15 lb de presión por 15 minutos. Una vez terminado el ciclo de esterilización, se dejó enfriar la jarra del biorreactor para conectarla al flujo de aire que sale del equipo de biorreactor; se conectaron también los sensores de pH y oxígeno y se dejó con flujo de aire por 12 horas. Transcurrido el tiempo, se calibró el sensor de oxígeno y se inició con la cinética. La metodología para la preparación del pre-inoculo, el ajuste de la densidad óptica

para la inoculación y conteo de UFC/mL fue similar que en la caracterización en matraces. Los tiempos de toma de muestra fueron los mismos que en matraces.

8.3.3 Caracterización Molecular.

En nuestro laboratorio de investigación previamente se diseñaron oligonucleótidos específicos para cinco de las bacterias: *Azospirillum brasilense* Sp7, *Gluconacetobacter diazotrophicus* PAL5^T, *Burkholderia unamae* MTI 641^T, *Sphingomonas* sp OF178, *Pseudomona putida* KT2440 (Vivanco-Calixto, tesis en proceso). En el caso de *Bradyrhizobium* sp MS22 no se han diseñado oligonucleótidos específicos. En el anexo 12.3 se encuentran descritas las secuencias de los oligonucleótidos utilizados en este trabajo. Se realizaron PCR de colonia para las cinco bacterias, las condiciones fueron las siguientes: Desnaturalización 95°/40 s alineamiento 61°/40 s elongación 72°/1 min, 30 ciclos, extensión 72°/5 min.

8.3.4 Caracterización de las cinéticas de crecimiento en Biorreactores co-cultivos.

Después del análisis de las cinéticas de crecimiento individuales, considerando pH, UFC/mL máximas, velocidad de crecimiento específica y la similitud entre las bacterias se realizaron las pruebas de co-cultivos. La preparación del pre-inoculo, ajuste de OD_{600nm} inicial fue similar a los experimentos anteriores. Sin embargo, tratándose de co-cultivos, las primeras estrategias consistieron en inocular a diferente tiempo, inoculando primero la bacteria más lenta y después de acuerdo a su velocidad de crecimiento se inoculó la más rápida. No obstante, debido a que los resultados no fueron satisfactorios se cambió la estrategia de inoculación, co-inoculando al mismo tiempo cada bacteria. La toma de muestra fue similar a los experimentos en matraces y cultivos individuales en biorreactor, la diferencia fue que al platear se hizo en dos o tres de los medios selectivos dependiendo si se hicieron co-inoculaciones de dos o tres bacterias. De esa forma se aseguró que de la misma muestra se contarán las bacterias de los diferentes géneros. Para la identificación molecular, se realizó la misma metodología que en la caracterización individual en biorreactor.

8.4 Cuantificación de sacarosa: Hidrólisis ácida-DNS.

Este método se basa en la hidrólisis ácida de la sacarosa y la medición posterior de los azúcares reductores libres por medio de la reducción del ácido dinitrosalicílico (DNS), el cual forma un compuesto nitro-amidado de color amarillo cuya densidad óptica es proporcional a la concentración de azúcares reductores (Miller 1959). Para llevar a cabo este ensayo se realizó una curva patrón con concentraciones de sacarosa. Las concentraciones utilizadas fueron de 0, 0.4, 0.8, 1.2, 1.6, 2, 3, 4, 5 y 6 g/L. De cada dilución se tomaron 500 μ L y se añadieron 500 μ L de HCl al 35%; la mezcla se colocó en un baño maría a 90 °C por 10 min y se colocó en hielo por 5 min. El siguiente paso fue añadir una gota de fenolftaleína y se agregó NaOH al 25% hasta obtener la coloración rosa que indica un pH alcalino. De este hidrolizado se tomaron 250 μ L a los cuales se le agregó 250 μ L de ácido 3-5-dinitrosalicílico, los tubos se colocaron nuevamente en un baño maría a 90 °C por 5 min y se enfriaron colocando los tubos en hielo por 5 min. Para finalizar, a cada tubo se le agregó 2.5 mL de agua destilada y se midió cada muestra en el espectrofotómetro a una longitud de onda de 540 nm. En el anexo 12.7 se muestran las curvas patrón realizadas. Para el procesamiento de las muestras a evaluar se realizó la misma metodología.

8.5 Análisis de metabolitos mediante HPLC.

La caracterización de metabolitos se realizó en un equipo HPLC Perkin Elmer serie 2000, equipado con una bomba serie 200, detector UV-vis 785 A, sistema de interface Network Chromatography modelo NC1900. Se utilizó una columna Aminex HPX-87H, 300 mm x 7.9 mm para separar los ácidos orgánicos. Las muestras de fermentación se centrifugaron tres veces a 13000 rpm/10 min. Posteriormente se inyectaron 20 μ L de cada muestra al cromatógrafo. El tiempo de procesamiento para cada muestra fue de 30 min. Se utilizó el estándar de ácidos orgánicos Bio-Rad (catálogo 125-0586) para la cuantificación. En anexo 12.8 se muestra el cromatograma de la muestra estándar y los cromatogramas de algunas muestras de fermentación.

9. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

9.1 Selección de los medios de cultivo para la propagación masiva de cada una de las especies bacterianas en cultivos sumergidos.

Para llevar a cabo el escalamiento de la producción del inoculante multi-especies EMMIM-1 de placas Petri a biorreactor es necesario definir el o los medios de cultivo que permitan una propagación masiva de bacterias en medio líquido. Con el objetivo de abatir costos es necesario contar con un medio de cultivo que permita el crecimiento de las seis bacterias que conforman el multi-inoculante y en altos números. Por tal motivo en primer lugar se decidió realizar una revisión bibliográfica. El criterio utilizado para la selección de los posibles medios de cultivo a utilizar fue que al menos alguno de los géneros bacterianos similares a los que conforman el inoculante se produjera en biorreactores. Los medios elegidos fueron LB modificado y el medio que denominamos Medio de Producción (Díaz-sáez, Ríos, y Alberto-casas 2013; Ju, Jiang, y Xu 2012; Sun *et al.*, 2015; Mutturi, Sahai y Sharma 2016; Xu *et al.*, 2015), los cuales se describen en el apartado de Materiales y Métodos. Es importante aclarar que el medio de producción se formuló con un sistema buffer de fosfatos con dos composiciones, una que da pH 5.5 para bacterias que prefieren un ambiente ácido y otra a pH 7 para las que crecen a pH neutro. Una vez seleccionados los dos medios de cultivo se procedió a evaluar el crecimiento microbiano de las seis bacterias en matraces de 250 mL y se comparó con los resultados obtenidos en los medios selectivos que comúnmente se usan en nuestro laboratorio. Desde un inicio se estandarizó que todos los pre-inóculos se prepararan en el medio de cultivo a evaluar y que tuvieran un tiempo de crecimiento en 24, 36 o 48 h según la cepa bacteriana. En cada uno de los resultados se nombrará a cada bacteria por su nombre de cepa: Sp7 para *Azospirillum brasilense* Sp7, MTI 641^T para *Burkholderia unamae* MTI 641^T, PAL5^T para *Gluconacetobacter diazotrophicus* PAL5^T, KT2440 para *Pseudomonas putida* KT2440, OF178 para *Sphingomonas* sp OF178, MS22 para *Bradyrhizobium* sp MS22.

9.1.1 Caracterización de la cinética de crecimiento en matraces.

En primer lugar se caracterizó el crecimiento de KT2440 en los medios líquidos. A partir de una colonia se inocularon los pre-inóculos y se incubaron por 24 h en LB (su medio selectivo), LB modificado y en el medio de producción (con pH 7) alcanzando números en el orden de 10^9 ufc/mL en el medio de producción y de 10^8 ufc/ml en los otros dos medios. El pH al final de la incubación de los tres pre-inóculos estaba en 9.2. En la figura 1A se encuentra la medición de la densidad óptica a 600 nm y en la figura 1B se muestra el \log_{10} de UFC/mL. LB y LB modificado presentan un comportamiento similar en densidades ópticas (figura 1A), siendo de 5.3 para LB en 18 h y 4.7 para LB modificado en 24 h. Cabe mencionar que aunque en el medio LB modificado se inició con un mayor número de UFC/mL, a las 18 h (figura 1B) ambos medios estaban en un orden de 10^9 . Con lo que se refiere al medio de producción, la densidad óptica fue menor respecto a los otros medios pero las UFC/mL llegaron a un orden de 10^{10} en 16 h. La segunda caracterización de crecimiento en los medios evaluados corresponde a *Sphingomonas* sp OF178. Las UFC/mL de los pre-inóculos en LB5% y LB modificado alcanzaron 10^9 ; y en el medio de producción en 10^{10} . Todos los pre-inóculos terminaron con pH alcalinos aunque el pH inicial en todos los medios fue 7. Como se ve en figura 1C, las mayores densidades ópticas se observaron en LB Modificado (24 h). En LB 5% no se observó aumento en la turbidez mientras que en el medio de producción su mayor densidad óptica corresponde a 3.39 en 9 h. En contraste, aunque en el medio LB*5% parecía que no había crecimiento inferido por la densidad óptica, se observa que llega a un alto número de UFC/mL (2.97×10^{10}) en 19 h. Estos resultados indican que la densidad óptica no necesariamente es un indicativo de crecimiento, sobre todo en bacterias que producen exo-polisacáridos (York, *et al.*, 1997). A pesar de que en los pre-inóculos se utilizaron las mismas condiciones de crecimiento, el único medio donde inició con un número menor de bacterias fue LB modificado. Esto puede deberse a que todos los cultivos se inocularon con una densidad óptica inicial de 0.1 con un volumen de pre-inóculo determinado a partir de la densidad óptica alcanzada por el pre-cultivo, al tener el LB modificado una mayor densidad óptica pero el mismo número de bacterias, un menor volumen de pre-inóculo explica el menor número inicial de bacterias. La tercera caracterización de crecimiento corresponde a *Bradyrhizobium* sp MS22. Las UFC/mL de los pre-inóculos se encontraban en 10^7 para LB y LB modificado, y en 10^9 para el medio de producción. El pH inicial de los pre-

inóculos fue de 7 y el final estaba entre 5.8 y 6.8. En la figura 1E se observa el cambio en la densidad óptica de los tres medios. El medio selectivo LB* presenta las menores densidades ópticas, siendo la máxima de 6 en 24 h. Por otra parte, los medios LB modificado y el medio de producción tienen las mayores densidades, 13.9 y 12.8 respectivamente. En el caso de ufc/mL en todos los medios se inicia en un orden de 10^6 UFC/mL, obteniéndose la mayor concentración bacteriana en 24 h. En este análisis se puede notar que desde las 12 h tanto en LB modificado y en el medio de producción ya se encuentran en un orden de 10^8 UFC/mL, y que hasta las 18 h en el medio selectivo llega a esa concentración celular. No se utiliza colorante en el medio LB* para evitar mediciones erróneas de turbidez.

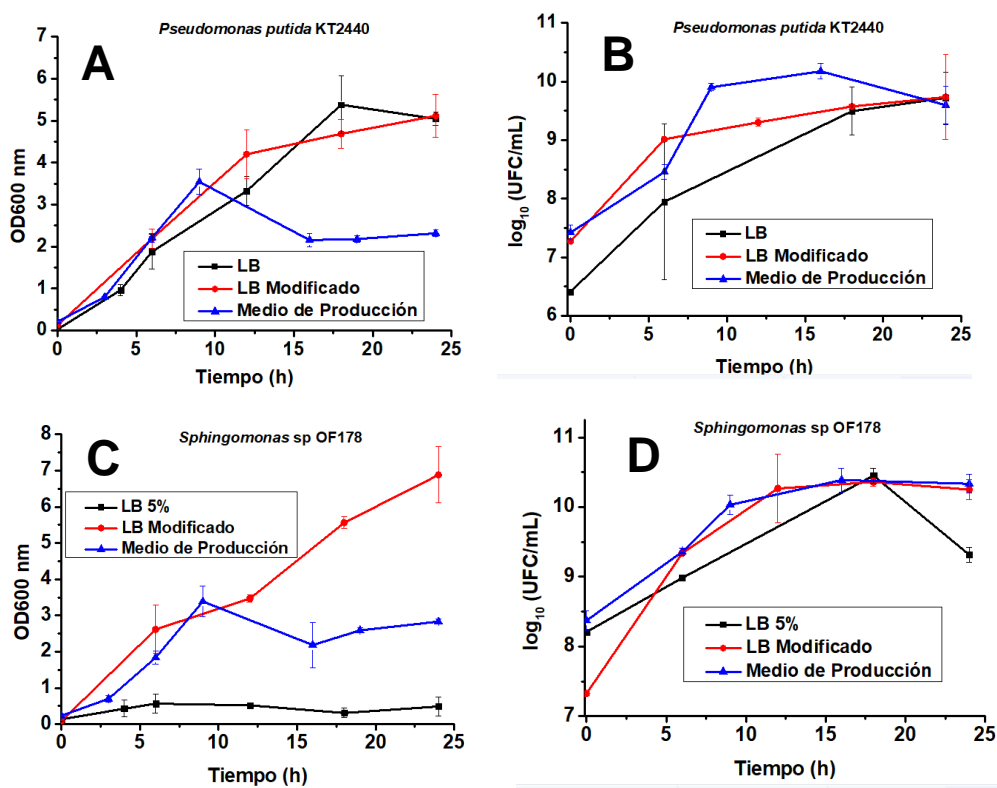


Figura 1: Evaluación del crecimiento de las bacterias en los medios de cultivo: medios selectivos, LB Modificado y Medio de Producción en matraces agitados. *Pseudomonas putida* KT2440: (A) Medición de la densidad óptica 600 nm, (B) Medición de UFC/mL, expresada en log₁₀. *Spingomonas* sp OF178: (C) Medición de la densidad óptica 600 nm, (D) Medición de UFC/mL, expresada en log₁₀. (Continúa en la siguiente página)

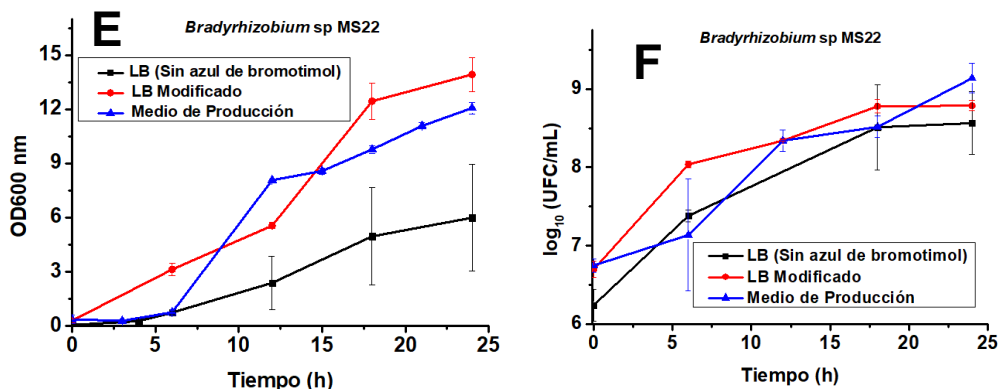


Figura 1 (Continuación): *Bradyrhizobium* sp MS22: (E) Medición de la densidad óptica 600 nm, (F) Medición de UFC/mL, expresada en \log_{10} .

En la figura 2 se encuentran las curvas del crecimiento de las tres bacterias restantes. Por lo que se refiere a **Sp7**, los pre-inóculos estaban en un orden de 10^9 ufc/mL en Rojo congo y en 10^{10} ufc/mL en los otros dos medios. En todos los pre-inóculos el medio alcanzó un pH final de 9.7, y en todos los casos el inicial fue 7. En cuanto a la medida de la densidad óptica (figura 2G) se puede ver un comportamiento diferente en los tres medios evaluados, siendo la menor la obtenida en su medio selectivo (rojo congo). La figura 1H corresponde a la medición de UFC/mL, se puede apreciar que las tres curvas presentaron un crecimiento similar, esto a pesar de que en el medio selectivo se alcanzó una menor turbidez. Lo anterior puede deberse a una mayor producción de exo-polisacárido, lo cual ya se ha reportado anteriormente (Valverde et al. 2008). No obstante, en el medio de producción desde las 12 h se alcanzaron cuentas bacterianas de 10^{10} UFC/mL; mientras que en los otros dos medios se logró después de 30 h. Con lo que se refiere a la caracterización de **PAL5^T** en los tres medios, solamente en uno (LB Modificado) no se observó cambios en la densidad óptica inicial. Es importante señalar que se realizaron diversas repeticiones en matraz y se evaluaron pH de 5.5 y 7 sin ningún cambio en la absorbancia del cultivo (Anexo 12.1). Además se sembró esta bacteria estriando en una placa de LB Modificado-agar y no se observaron colonias (datos no mostrados). Por lo anterior se decidió no monitorear las UFC/mL en este medio. La falta de crecimiento en este medio puede deberse a la presencia de NaCl (Oliveira *et al.*, 2016). En cuanto al pH final de los pre-inóculos en los otros dos medios, en LGI estaba en 4.5, y en el medio de producción en 6.7, siendo el inicial de 5.5 en ambos medios. Cabe señalar que la morfología de las bacterias en ambos cultivos resultaron ser las esperadas (anexo 12.1). Ambos pre-inóculos tenían bacterias en un orden de 10^9 UFC/mL. Analizando

la figura 2I se observa que las mayores densidades ópticas se alcanzaron en el medio de producción, al igual que el número de UFC/mL (figura 2J), alcanzando 10^9 en 24 h. Sin embargo, en el medio LGI se alcanzó ese mismo orden de 10^9 en 48 h. La última bacteria caracterizada corresponde a **MTI 641^T**. Al realizar la evaluación en los tres medios, en LB Modificado no se observó un aumento en la densidad óptica al igual que sucedió con *Gluconacetobacter diazotrophicus* PAL5^T. Se realizaron pruebas en LB Modificado a pH 5.5 y 7, midiendo densidad óptica a las 24 y 36 h. La densidad óptica en la hora 24 estaba en 0.1 en pH 7 y en 1 en pH 5.5 para la hora 36. Cuando se midió la densidad óptica a la hora 36, a pH de 7 resultó igual que la inicial y en pH de 5.5 era de 0.8 (anexo 12.1). Estos datos sugieren que a pH de 7 podría haber inhibición del crecimiento de *Burkholderia unamae* MTI 641^T. Se debe aclarar que las pruebas a pH de 5.5 en LB Modificado se realizaron tiempo después de obtener los datos del gráfico de la figura 2 (K y L), por lo que pensando que no había crecimiento en LB Modificado no se realizó el monitoreo de UFC/mL. En cuanto al pH final de los pre-inóculos en medio BAc y medio de producción, se encontraron en 9.27, y el número de bacterias se encontraba en 10^7 para BAc y en 10^8 para el medio de producción. En la figura 2K ambos medios presentan un comportamiento similar en densidades ópticas en las primeras 18 h. Sin embargo, a las 36 h el medio de producción tiene una mayor densidad óptica que no se vio reflejada en un mayor número de UFC/mL (gráfica L).

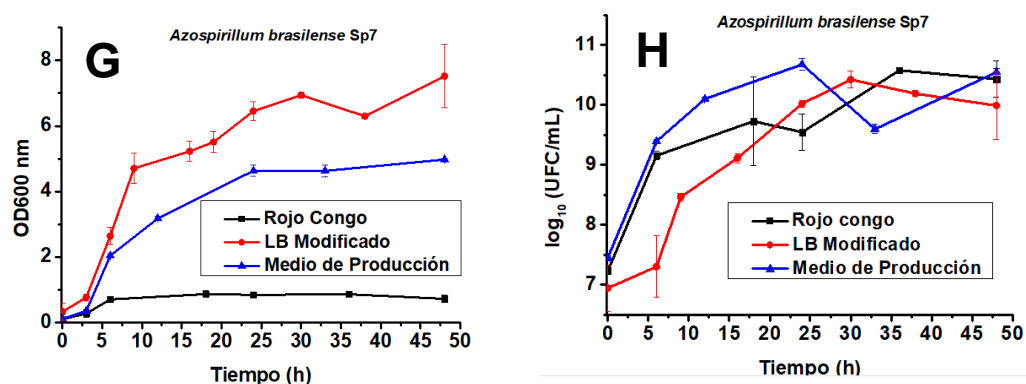


Figura 2: Evaluación del crecimiento de las bacterias en los medios de cultivo: medios selectivos, LB Modificado y Medio de Producción en matraces agitados. *Azospirillum brasilense* Sp7: (G) Medición de la densidad óptica 600 nm, (H) Medición de UFC/mL, expresada en log₁₀. (Continúa en siguiente página)

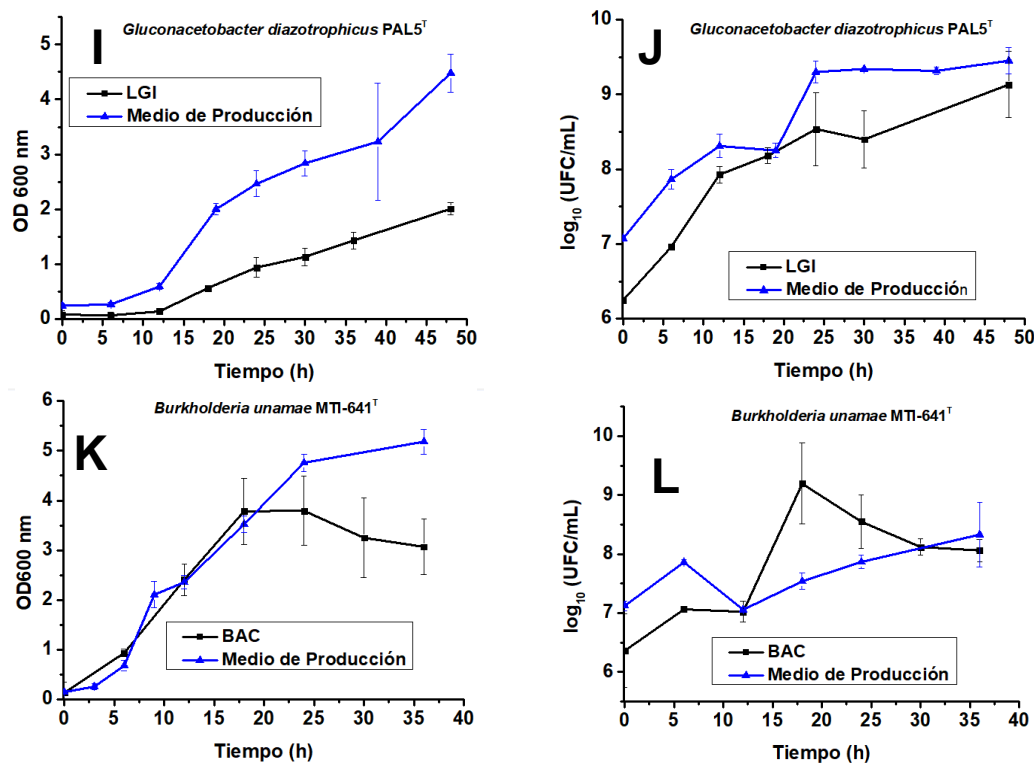


Figura 2 (Continuación): Evaluación del crecimiento de las bacterias en los medios de cultivo: medios selectivos, LB Modificado y Medio de Producción en matraces agitados. *Gluconacetobacter diazotrophicus* PAL5^T: (I) Medición de la densidad óptica 600 nm, (J) Medición de UFC/mL, expresada en log₁₀. *Burkholderia unamae* MTI 641^T: (K) Medición de la densidad óptica 600 nm, (L) Medición de UFC/mL, expresada en log₁₀.

En general, las curvas de crecimiento en los medios selectivos líquido muestran que los tiempos en los que se alcanza la fase estacionaria son más cortos que aquellos reportados en medios selectivos con agar (24, 36 y 48 h). Posiblemente una mayor disponibilidad de oxígeno u otro nutriente debido al mezclado promovido por la agitación hizo la diferencia. La productividad de los medios se determinó la siguiente ecuación 1:

$$Productividad = \frac{\log_{10} \text{ número máximo de } \frac{UFC}{mL} - \log_{10} \text{ número inicial de } \frac{UFC}{mL}}{t_2 - t_1} = \frac{1 \log_{10} \left(\frac{UFC}{mL} \right)}{h}$$

Donde

t_2 corresponde al tiempo en el cual se alcanzan los números máximos de ufc/mL y t_1 es el tiempo inicial.

Ecuación 1

Las productividades de los medios evaluados se resume en la tabla 2, como se mencionó anteriormente ni *Gluconacetobacter diazotrophicus* PAL5^T ni *Burkholderia unamae* MTI 641^T crecieron en el medio LB Modificado.

Tabla 2: Productividades de los medios evaluados.

PRODUCTIVIDAD			
Bacteria	Medio	log ₁₀ (UFC/mL)/h	Δt (h)
KT2440	LB	0.17 ± 0.02	18
	LB Modificado	0.13 ± 0.004	18
	Medio producción	0.28 ± 0.01	9
OF178	LB5%	0.12 ± 0.005	18
	LB Modificado	0.25 ± 0.04	12
	Medio producción	0.18 ± 0.03	9
MS22	LB	0.13 ± 0.04	18
	LB Modificado	0.14 ± 0.01	12
	Medio producción	0.13 ± 0.004	12
Sp7	Rojo Congo	0.14 ± 0.04	18
	LB Modificado	0.14 ± 0.01	24
	Medio producción	0.22 ± 0.01	12
PAL^{5T}	LGI	0.096 ± 0.02	24
	Medio producción	0.093 ± 0.01	24
MTI 641^T	BAC	0.16 ± 0.04	18
	Medio producción	0.03 ± 0.02	36

Los resultados muestran que en el medio de producción todas las bacterias evaluadas crecieron y en altos números. Cabe destacar que al realizar formulaciones de inoculantes líquidos, es importante obtener altos números de poblaciones microbianas viables; ya que durante el almacenamiento la viabilidad bacteriana comienza a decrecer. Además, al inocular las semillas e introducirlas al suelo existe una competencia con las bacterias nativas del suelo; por lo que elevados números de bacterias viable garantizan la colonización de las raíces de las plantas (Arora 2015).

El objetivo principal en estos primeros experimentos fue el encontrar un medio en el cual todas las bacterias pudieran crecer y en segundo lugar realizar la producción masiva de este inoculante. Por tal motivo, se decidió elegir al medio de producción para evaluarlo en biorreactores de escala laboratorio de un litro.

9.2 Establecer/desarrollar el proceso de producción en biorreactor y caracterización de la cinética de crecimiento de cada especie.

La caracterización de la cinética de crecimiento en biorreactor escala laboratorio de 1 L se realizó con el medio de producción. La preparación de todos los pre-inóculos y la toma de muestra fueron similares a la caracterización en matraces. Para este objetivo sólo se hicieron dos repeticiones de cultivo en biorreactor para cada bacteria.

9.2.1 Caracterización del crecimiento de *Sphingomonas* sp. OF178

La primera bacteria que se caracterizó en biorreactor fue *Sphingomonas* sp OF178. En la figura 3A se muestran las densidades ópticas y en la figura 3B el número de bacterias y consumo de sacarosa. Las réplicas de los cultivos resultaron similares en cuanto al incremento en densidades ópticas así como en el número de bacterias (UFC/mL); obteniendo en 12 h los mayores valores para ambas mediciones (6 densidades y 3.58×10^{10} UFC/mL). La productividad del medio de producción en biorreactor fue de $0.22 \pm 0.11 \log_{10}$ (UFC/mL)/h lo cual resultó mayor a lo que se obtuvo en matraces en dicho medio ($0.18 \pm 0.03 \log_{10}$ (UFC/mL)/h). La concentración inicial de sacarosa en el medio de producción fue de 20 g/L y en la figura 3B se encuentra el perfil de consumo de sacarosa, donde se puede ver que el mayor consumo se da en las primeras 10 h, después ya no se consume y permanece constante en $5-8$ g/L. Se puede observar que la fuente de carbono no es limitante y que la bacteria entra en la fase estacionaria posiblemente por el agotamiento/acumulación de otro metabolito.

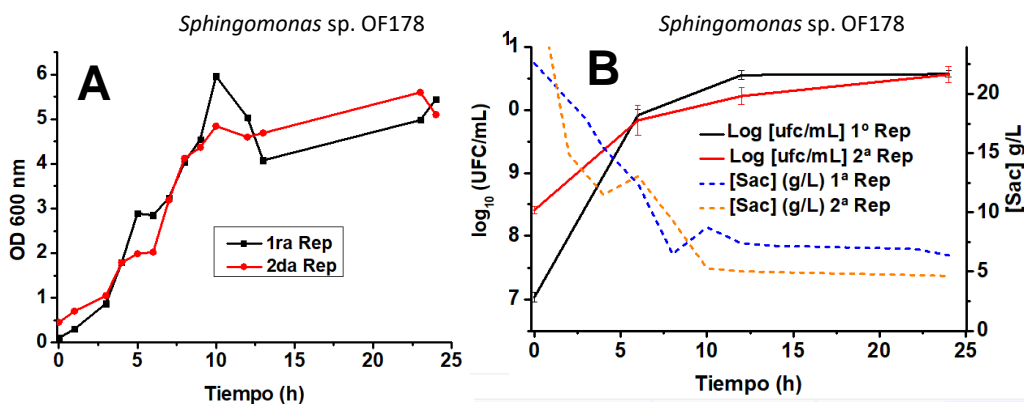


Figura 3. Curva de crecimiento de *Sphingomonas* sp. OF178 en el medio de producción con sacarosa como fuente de carbono.

A. Medición de la densidad óptica 600 nm con respecto al tiempo.

B. Medición de UFC/mL, expresada en \log_{10} y consumo de sacarosa con respecto al tiempo.

Como implementación de una medida de calidad y para asegurar que no se presenta ningún tipo de contaminación cuando las bacterias se cultivan en biorreactores se utilizó como estrategia la amplificación de genes específicos de cada bacteria. Las condiciones de PCR se encuentran descritas en materiales y métodos y las secuencias de los oligonucleótidos en el anexo 12.3.

9.2.1.1 Identificación molecular y fenotípica de *Sphingomonas* sp. OF178 en muestras de fermentación.

Para identificar las cepas bacterianas en las muestras de fermentación, sobre todo en los ensayos en co-cultivo, se realizaron pruebas morfológicas en medios selectivos gelificados y pruebas moleculares. Para ello se amplificó el gen 16S rDNA con oligonucleótidos específicos de *Sphingomonas*. Para el caso de *Sphingomonas* sp OF178 el tamaño de la banda amplificada en el carril 2 de la figura 3.1 corresponde al valor esperado de 376 pb de acuerdo a lo obtenido por Vivanco-Calixto, (Tesis en Proceso). En la figura 3.3 podemos observar la morfología característica de *Sphingomonas* en su medio selectivo LB5% de la muestra proveniente de biorreactor. Con estas dos pruebas es posible asegurar la ausencia de contaminación en biorreactor.

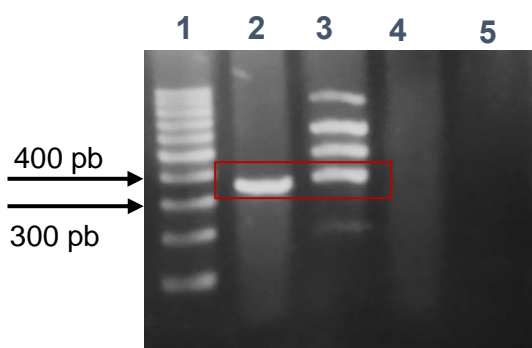


Figura 3.1. Amplificación del gen 16s rDNA de *Sphingomonas* sp. **OF178** mediante PCR de colonia. Gel de agarosa al 2%; marcador de 100 a 1000 pb. Peso esperado de 376 pb. Carril 1: Marcador, Carril 2: **PCR de colonia proveniente de biorreactor de OF178**, Carril 3: Control positivo proporcionado por Vivanco-Calixto, Carril 4: Control negativo (*E. coli* DH5 α), Carril 5: segundo control negativo (palillo).

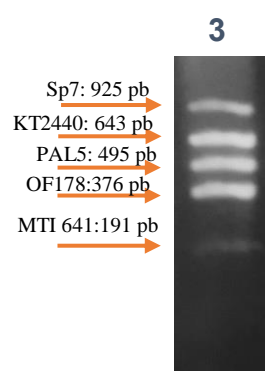


Figura 3.2 Pesos moleculares reportados por Vivanco-Calixto (Tesis en Proceso) para cada una de las bacterias del inoculante

Figura. 3.3 Crecimiento de *Sphingomonas* sp. OF178 proveniente de biorreactor en LB5%.



9.2.2 Caracterización del crecimiento de *Azospirillum brasilense* Sp7.

La segunda bacteria caracterizada corresponde a *Azospirillum brasilense* Sp7. En la figura 4C se encuentra representada la medida de la densidad óptica que fue de 4 para ambas repeticiones. En la figura 2D se observa el crecimiento en UFC/mL y el consumo de sacarosa. Se puede apreciar que después de las 16 h se alcanzan las mayores ufc/mL (2×10^9), y desde ese tiempo hasta la hora 48 el crecimiento no fue significativo. Es importante considerar que aunque los rendimientos en UFC/mL fueron ligeramente menores comparado con la caracterización en matraz, los tiempos de fermentación fueron más cortos, lo que produjo productividades similares en ambos sistemas (0.126 ± 0.01 vs. 0.13 ± 0.1). También fue observado que en medio líquido, rojo congo o medio de producción, sólo se requieren 24 h para producir los máximos números de UFC/mL, y no las 48 h establecidas para los medios gelificados (rojo congo-agar). Con lo que respecta al consumo de sacarosa, la bacteria sólo consumió 5 g/L, lo cual nos sugiere que el crecimiento de la bacteria no se debe completamente al consumo de sacarosa si no a otro tipo de nutriente presente en el medio.

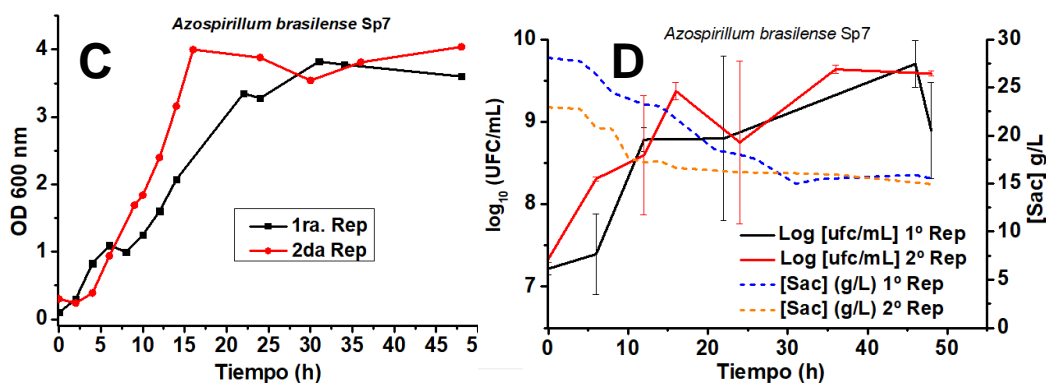


Figura 4. Curva de crecimiento de *Azospirillum brasilense* Sp7 en el medio de producción con sacarosa como fuente de carbono.

C. Medición de la densidad óptica 600 nm con respecto al tiempo.

D. Medición de UFC/mL, expresada en \log_{10} y consumo de sacarosa con respecto al tiempo

9.2.2.1 Identificación molecular y fenotípica de *Azospirillum brasilense* Sp7 en muestras de fermentación.

Para la caracterización molecular de la bacteria se amplifica el gen *laf1* de *Azospirillum brasilense* Sp7, que codifica para la síntesis de flagelo lateral. El resultado se muestra en la figura 4.1. El peso esperado es de 925 pb de acuerdo a lo observado en el laboratorio por Vivanco-Calixto, (Tesis en proceso), correspondiendo a este peso la banda amplificada en el carril 2, que es la muestra proveniente de biorreactor. Morfológicamente también se obtuvieron colonias rojo escarlata, típicas de *A. brasilense* Sp7 crecidas en su medio selectivo rojo congo (figura 4.3).

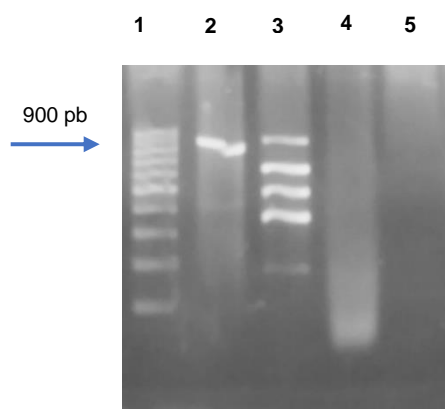


Figura 4.1 Amplificación de gen *laf1* de *Azospirillum brasilense* Sp7 mediante PCR de colonia. Gel de agarosa al 2%; marcador de 100 a 1000 pb. Peso esperado de 925 pb. Carril 1: Marcador, Carril 2: **PCR de colonia proveniente de biorreactor de Sp7**, Carril 3: Control positivo proporcionado por Vivanco-Calixto, Carril 4: Control negativo (*E. coli* DH5 α), Carril 5: segundo control negativo (palillo).

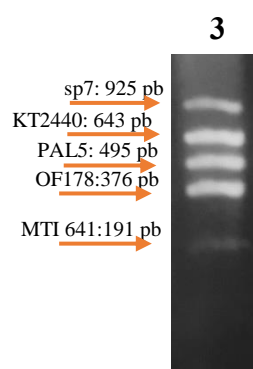


Figura 4.2 Pesos moleculares reportados por Vivanco-Calixto (Tesis en proceso) para cada una de las bacterias del inoculante

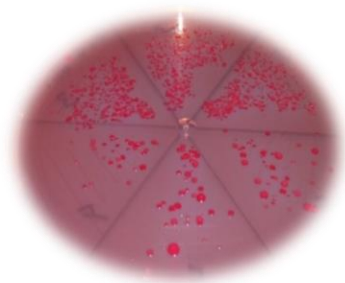


Figura 4.3 Crecimiento de *Azospirillum brasilense* Sp7 proveniente de biorreactor en rojo congo.

9.2.3 Caracterización del crecimiento de *Pseudomonas putida* KT2440.

La evaluación de la tercera bacteria corresponde a *Pseudomonas putida* KT2440. Esta bacteria creció totalmente diferente en biorreactor comparado con su crecimiento en matraz. En la figura 5E se encuentran representadas las gráficas de densidad óptica y en la figura 5F ufc/mL y consumo de sacarosa. De acuerdo a lo observado en la Figura 5E, las primeras 6 h

es donde se obtuvieron las mayores densidades ópticas (6 y 1.5), a partir de ahí se observó una caída en la densidad óptica siendo de dos unidades para la primer repetición y una unidad de absorbancia para la segunda repetición; decremento que también se puede apreciar en la figura 5F que corresponde a la medición de UFC/mL (10^6 y 10^8). La velocidad de agitación en el biorreactor alcanzó sus máximos valores a las 6 h para satisfacer la alta demanda de oxígeno (debido a la alta actividad metabólica de la bacteria). Para esta bacteria, en particular la producción de espuma en el biorreactor fue excesiva; fue imposible controlar el pH (anexo 12.2) y oxígeno, a la hora 6. La concentración de oxígeno disuelto $[O_2]$ estaba en 0%, pese a la alta velocidad de agitación. Podríamos atribuir a esto la caída en el conteo de UFC/mL ya que en la espuma se pudieron haber quedado la mayoría de las bacterias. Esta situación se puede remediar utilizando un antiespumante.

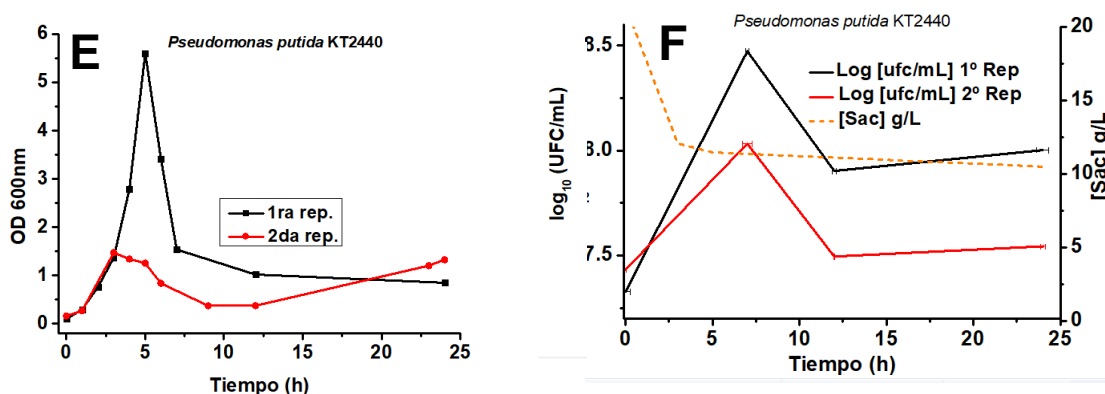


Figura 5 Curva de crecimiento de *Pseudomonas putida* KT2440 en el medio de producción con Sacarosa como fuente de carbono.

- Medición de la densidad óptica 600 nm con respecto al tiempo.
- Medición de UFC/mL, expresada en \log_{10} y consumo de sacarosa con respecto al tiempo.

9.2.3.1 Identificación molecular y fenotípica de *Pseudomonas putida* KT2440 en muestras de fermentación.

Para la identificación molecular de esta bacteria, se amplificó el gen que codifica a la proteína Flim que es un componente del interruptor flagelar para la rotación de flagelo. En la figura 5.1 podemos notar que la banda amplificada en el carril 4 corresponde al peso esperado de 643 pb, los carriles 1 y 2 son los controles negativos. Fenotípicamente también corresponde a lo esperado de acuerdo a lo reportado en nuestro laboratorio, ya que es una colonia grande, olor fétido, viscosa, ligeramente de consistencia cremosa y con la formación de pigmento amarillo alrededor de la placa, que es característico de esta bacteria (figura 5.2).

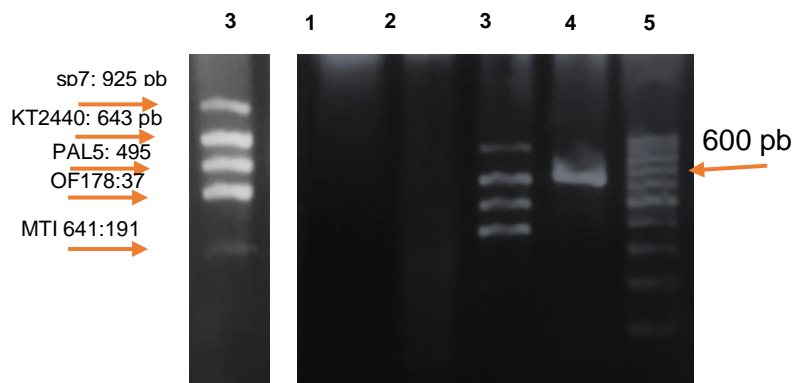


Figura 5.1. Amplificación de gen *fliM* de *Pseudomonas putida* **KT2440** mediante PCR de colonia. Gel de agarosa al 2%, marcador de 100 a 1000 pb. Peso esperado de 643 pb. Carril 1: control negativo (palillo), Carril 2: Control negativo (*E. coli* DH5 α), Carril 3: Control positivo proporcionado por Vivanco-Calixto, Carril 4: **PCR de colonia proveniente de biorreactor de KT2440**, Carril 5: Marcador.



Figura. 5.2 Crecimiento de *Pseudomonas putida* KT2440 proveniente de biorreactor en LB.

9.2.4 Caracterización del crecimiento de *Bradyrhizobium* sp. MS22.

La siguiente bacteria caracterizada en biorreactor corresponde a *Bradyrhizobium* sp. MS22. La figura 6G contiene el gráfico de densidades ópticas, y la figura 6H las ufc/mL y consumo de sacarosa. Se puede apreciar un incremento uniforme en densidades ópticas (Figura 6G) alcanzándose las mayores densidades después de 15 h. Con lo que respecta al número de bacterias (figura 6H), después de 12 h se obtiene la mayor concentración (5×10^8 ufc/mL). La bacteria inicia la fase estacionaria de crecimiento a partir de la hora 12, sin embargo, la sacarosa se sigue consumiendo hasta la hora 24. El comportamiento de esta bacteria fue similar a su evaluación en matraz y las productividades fueron diferentes (0.21 ± 0.02 en biorreactor vs. 0.13 ± 0.004 en matraz en \log_{10} (ufc/mL)/h).

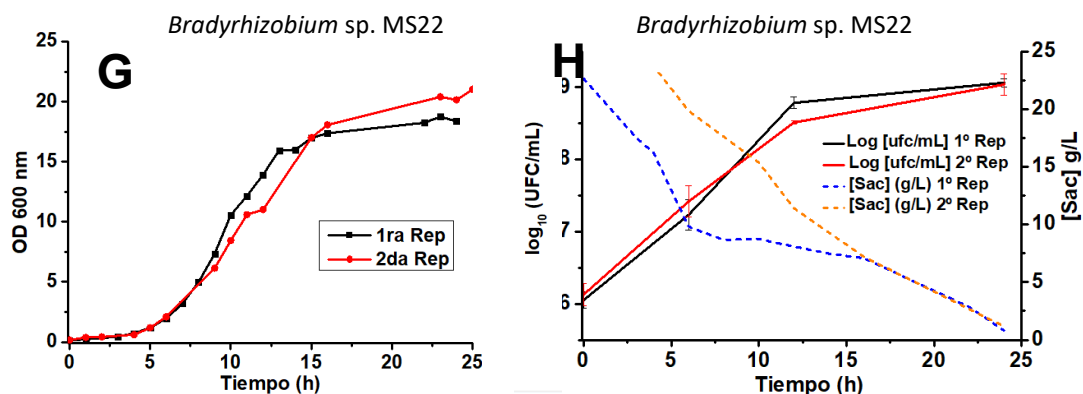


Figura 6. Curva de crecimiento de *Bradyrhizobium sp. MS22* en el medio de producción con sacarosa como fuente de carbono.

G. Medición de la densidad óptica 600 nm con respecto al tiempo.

H. Medición de UFC/mL, expresada en \log_{10} y consumo de sacarosa con respecto al tiempo.

Bradyrhizobium sp. MS22 es la única bacteria que no se ha caracterizado molecularmente, sin embargo, posee una característica fenotípica única que hace posible su identificación, ya que es una colonia blanca, redonda que cambia de coloración su medio selectivo, de verde a azul como se muestra en la figura 6.1.

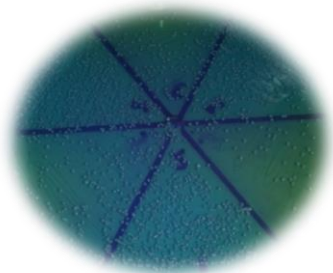


Figura 6.1 Crecimiento de *Bradyrhizobium sp. MS22* proveniente de biorreactor en LB + Azul de bromotimol.

9.2.5 Caracterización del crecimiento de *Burkholderia unamae* MT1-641^T

Cuando se realizó la caracterización en matraces (figura 2 K y L), esta bacteria no presentó un buen crecimiento en ufc/mL con sacarosa como fuente de carbono, sólo creció en un orden de magnitud (de 10^7 a 10^8), por lo que en su momento se pensó crecer a esta bacteria en el medio de producción pero con ácido succínico como fuente de carbono, ya que Caballero-Mellado *et al.* 2004 había reportado que *Burkholderia unamae* MT1641^T no consumía sacarosa pero si ácido succínico. Siendo *Burkholderia* substrato-selectiva se pensó en cultivarla con otra bacteria que consumiera sacarosa para evitar competencia por la misma fuente de carbono; ya que el objetivo tres de este trabajo se refiere a la evaluación de las

posibles co-inoculaciones de dos o tres bacterias para su crecimiento en biorreactor. Por lo que después de ensayar con succinato como fuente de carbono en el cultivo en biorreactor, sólo se logró hacer una fermentación con sacarosa en biorreactor. En la figura 7I se representan densidades ópticas, y en la figura 7J UFC/mL y consumo de sacarosa. Como se puede observar, en biorreactor se presentó un comportamiento diferente al de los matraces, mayor crecimiento y si hay consumo de sacarosa. En el biorreactor se obtienen más de 15 unidades de densidad óptica y casi tres órdenes de magnitud en el crecimiento, mientras que en el matraz se obtuvieron 5 densidades ópticas y crecimiento en un orden. Sin embargo aunque en biorreactor se observó tres veces más densidad óptica, en crecimiento sólo aumentó en un orden de magnitud (10^9 vs 10^8 UFC/mL).

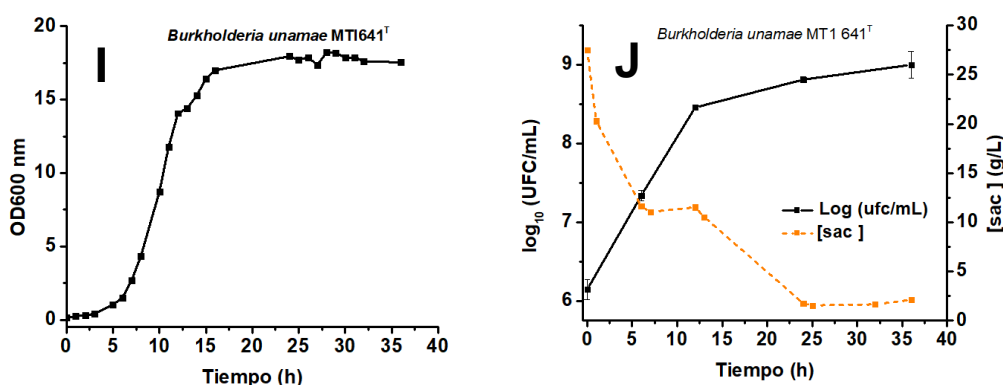


Figura 7. Curva de crecimiento de *Burkholderia unamae* MTI 641^T en el Medio de Producción con sacarosa como fuente de carbono.

O. Medición de la densidad óptica 600 nm con respecto al tiempo.

P. Medición de UFC/mL, expresada en log₁₀ y consumo de sacarosa con respecto al tiempo.

9.2.5.1 Identificación molecular y fenotípica de *Burkholderia unamae* MTI 641^T en muestras de fermentación.

En cuanto a la caracterización molecular, aunque ya se tienen oligonucleótidos específicos para esta bacteria, fue difícil amplificar el gen que codifica para la subunidad *fenol hidroxilasa*. En un principio se creyó que los oligonucleótidos estaban contaminados, pero después de utilizar otros oligonucleótidos tampoco se observó ninguna banda. Como estrategia alternativa, se amplificó el gen 16S rDNA, posteriormente se realizó una digestión con la enzima HhaI para ver si el patrón de bandeo correspondía a la cepa tipo, obteniéndose el mismo perfil de restricción (figura 7.1) (Morales-García *et al.*, 2014). Respecto a la caracterización fenotípica resultó la esperada: colonia amarilla, redonda, cambia de color el

medio BAc de amarillo a azul, lo cual se debe a la alcalinización del medio, ya que el pH inicial del medio gelificado es de 5.5 (figura 7.2).

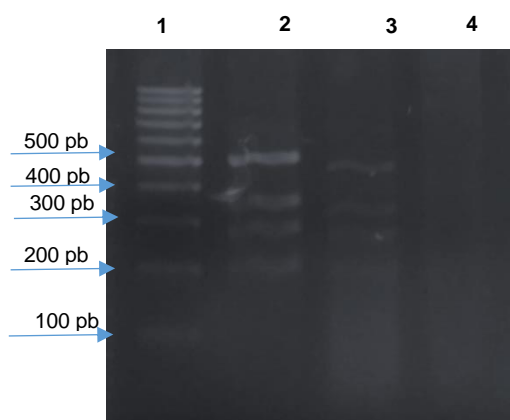


Figura 7.1. Perfil de bandeo característico de *Burkholderia unamae* MT1 641^T de la digestión con la enzima Hha1. Gel de agarosa al 2%; marcador de 100 a 1000 pb. Carril 1: Marcador, Carril 2: Control positivo (digestión realizada con cepa tipo), **Carril 3: Muestra digerida con la enzima, proveniente de biorreactor**, Carril 4: Control negativo (Agua)

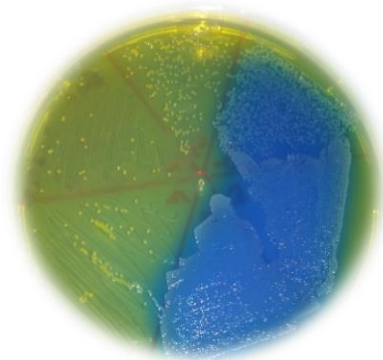


Figura 7.2 Crecimiento de *Burkholderia unamae* MT1 641^T proveniente de biorreactor en BAc.

9.2.6 Caracterización del crecimiento de *Gluconacetobacter diazotrophicus* PA15^T

La última bacteria caracterizada en biorreactor corresponde a *Gluconacetobacter diazotrophicus* PA15^T. En la figura 8K y L se representa la medición de absorbancia, el número de ufc/mL y consumo de sacarosa. En la figura 8K se observa el incremento de densidades ópticas, el cual está casi al doble del valor (8 en 48 h) obtenido en el ensayo en matraces (4.5 en 48 h), sin embargo las UFC/mL están en los mismos órdenes en ambos experimentos (3.75×10^9 en 24 h). Con este resultado en matraz y biorreactor se puede afirmar que sólo son necesarias 24 h para alcanzar la fase estacionaria de esta bacteria y no las 48 h previamente establecidas (Boniolo et al. 2009). La productividad en matraz y biorreactor en el medio de producción resultaron similares, 0.096 ± 0.01 y $0.09 \pm 0.01 \log_{10}$ (UFC/mL)/h.

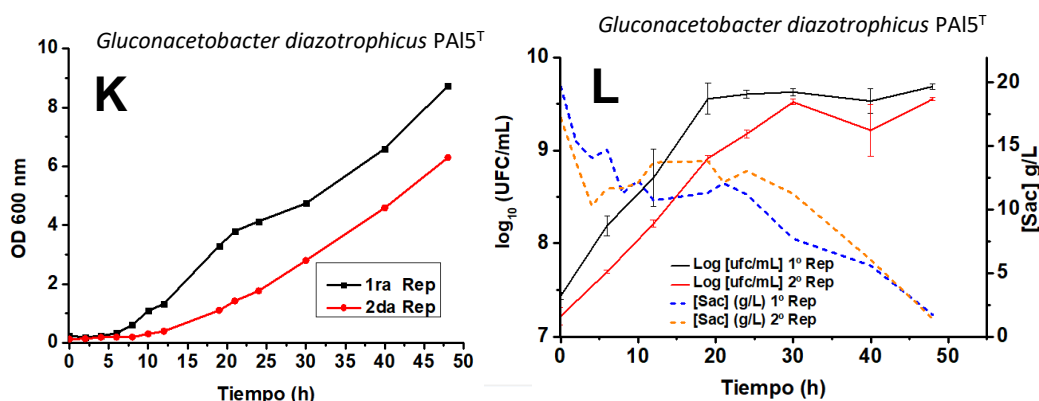


Figura 8. Curva de crecimiento de *Gluconacetobacter diazotrophicus* PAI5^T en el medio de producción con sacarosa como fuente de carbono.

K. Medición de la densidad óptica 600 nm con respecto al tiempo.

L. Medición de UFC/mL, expresada en log₁₀ y consumo de sacarosa con respecto al tiempo.

9.2.6.1 Identificación molecular y fenotípica de *Gluconacetobacter diazotrophicus* PAI5^T en muestras de fermentación.

Referente a la caracterización molecular de *Gluconacetobacter diazotrophicus* PAI5^T, se amplificó el gen que codifica la quinoproteína alcohol deshidrogenasa (*adhs-pqq*), que es común encontrarla en la bacteria debido a la forma en que metaboliza la fuente de carbono, ya que carece de un transportador de sacarosa (Chávez-Pacheco *et al.*, 2010; Sará-Páez *et al.* 2015). En la caracterización molecular se obtuvo un producto de PCR de 495 pb que corresponde a lo esperado de acuerdo al control positivo (figura 8.1); así mismo, el fenotipo fue el esperado, presentándose primeramente colonias transparentes, que con el paso del tiempo fueron cambiando ligeramente a color amarillo (figura 8.2). El medio LGI tiene en su composición el colorante azul de bromotimol, este colorante deja un tono amarillo al preparar el medio, no obstante, debido a las complicaciones que se tuvieron en un inicio en diferenciar la morfología de la bacteria, se sugirió adicionarle al medio LGI el colorante verde de bromocresol para que al momento de preparar el medio diera una tonalidad verde, por lo tanto la bacteria crece hay un cambio de coloración de verde a amarillo, este cambio en la coloración indica que la bacteria acidifica el medio por las excreciones de metabolitos o

ácidos orgánicos. También se observa que conforme pasa el tiempo, la bacteria va absorbiendo el colorante del medio.

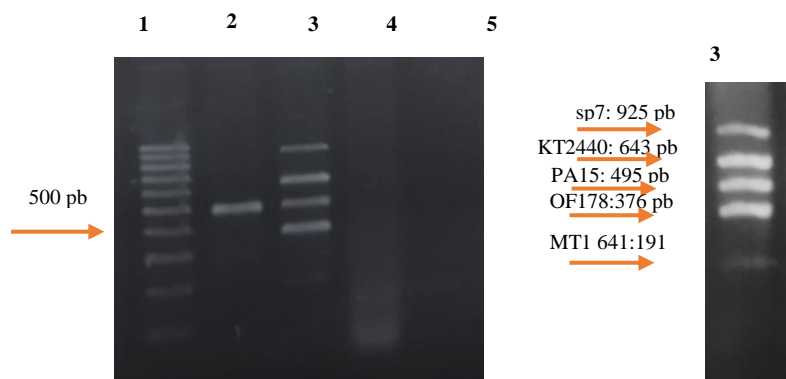


Figura 8.1. Amplificación del gen que codifica para *alcohol deshidrogenasa* (ADHs-quinona) de *Gluconacetobacter diazotrophicus* PA1^{5T} mediante PCR de colonia. Gel de agarosa al 2%; marcador de 100 a 1000 pb. Peso esperado de 495 pb. Carril 1: Marcador, Carril 2: **PCR de colonia proveniente de biorreactor de PAL5^T**, Carril 3: Control positivo proporcionado por Vivanco-Calixto, Carril 4: Control negativo (*E. coli* DH5α), Carril 5: segundo control negativo (palillo).

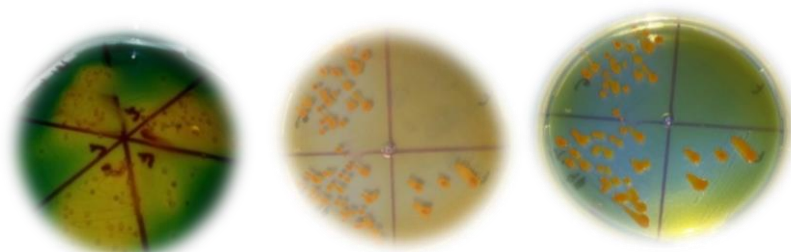


Figura 8.2 Crecimiento de *Gluconacetobacter diazotrophicus* PAL5^T proveniente de biorreactor en LGI.

Las productividades obtenidas en la caracterización del crecimiento en biorreactor para las seis bacterias se presentan en la tabla 3:

Tabla 3. Productividades obtenidas en cultivos individuales en biorreactor con el Medio de Producción.

PRODUCTIVIDAD		
BACTERIA	log ₁₀ (UFC/mL)/h	Δ t (h)
PA15 ^T	0.09 ± 0.01	24
KT2440	0.154 ± 0.038	6
Sp7	0.1 ± 0.04	24
OF178	0.22 ± 0.11	12
MS22	0.21 ± 0.02	12
MTI	0.279 ± 0.1	12

9.3 Evaluación de ácido succínico como fuente de carbono alternativa para co-inoculaciones.

Con la intención de utilizar una fuente de carbono alterna a la sacarosa que evite la competencia por un mismo sustrato en los co-cultivos en el medio denominado Medio de producción, se decidió evaluar ácido succínico como fuente de carbono en el medio de producción ya que se ha reportado que *Azospirillum brasilense* (Reis-Massena 2015; Goebelt y Krieg 1984) y *Burkholderia unamae* (Caballero-Mellado *et al.*, 2004; Perin *et al.* 2006), así como *Pseudomonas putida* (Nikel *et al.*, 2015) crecen bien en ácidos orgánicos. Además, el ácido succínico es parte de la composición de los medios selectivos BAc (para *Burkholderia unamae*) y rojo congo (para *Azospirillum brasilense* Sp7). A continuación se presentan los resultados de tres repeticiones en matraces para las tres bacterias, dos en biorreactor para *B. unamae* MTI 641^T y *P. Putida* KT2440, y una para *A. brasilense* Sp7.

9.3.1 Caracterización de *Burkholderia unamae* MT1 641^T, *Pseudomonas putida* KT2440 y *Azospirillum brasilense* Sp7 en matraces con ácido succínico.

En la figura 9 se muestran las gráficas de la densidad óptica y UFC/mL de las tres bacterias evaluadas en matraz con ácido succínico como fuente de carbono en el medio de producción. El cultivo de *Burkholderia unamae* MTI641^T, presentó un aumento continuo tanto en densidades ópticas (figura 9A) como en UFC/mL (figura 9B), obteniéndose en 12 h los números máximos de UFC/mL (1.21×10^9) y en 16 horas las densidades ópticas más altas. Al comparar el crecimiento de *B. unamae* MTI641^T con ácido succínico y sacarosa en matraz, se obtiene una mayor productividad en ácido succínico $0.15 \pm 0.01 \log_{10}$ (UFC/mL)/h que en sacarosa $0.03 \pm 0.02 \log_{10}$ (UFC/mL)/h. En la figura 9C-D se muestra la densidad óptica y ufc/mL de *Azospirillum brasilense* Sp7 con ácido succínico. La fase estacionaria se alcanza a las 24 h (figura 9D) y aunque el valor de densidad óptica se duplicó en el periodo de las 24 a las 48 h, la cantidad de bacterias no aumentó significativamente. La productividad del cultivo en matraz en succínico a las 19 h fue de $0.12 \pm 0.05 \log_{10}$ (UFC/mL)/h mientras que en sacarosa fue de $0.22 \pm 0.01 \log_{10}$ (UFC/mL)/h. En la cinética de crecimiento de *Pseudomonas putida* KT2440 con ácido succínico en matraz (Figura 9F) se requirieron 19 h para alcanzar la fase estacionaria mientras que con sacarosa (medio de producción, Figura

1B) sólo se requirieron 10 h. Las productividades a dichos tiempos de cultivo fueron $0.112 \pm 0.05 \log_{10} (\text{UFC/mL})/\text{h}$ y $0.28 \pm 0.01 \log_{10} (\text{UFC/mL})/\text{h}$, respectivamente. En este caso el cultivo de *P. putida* KT2440 fue más productivo en sacarosa. Estos resultados en matraz nos dieron certeza para ahora explorar el crecimiento de estas tres bacterias con ácido succínico como fuente de carbono en cultivos en biorreactor.

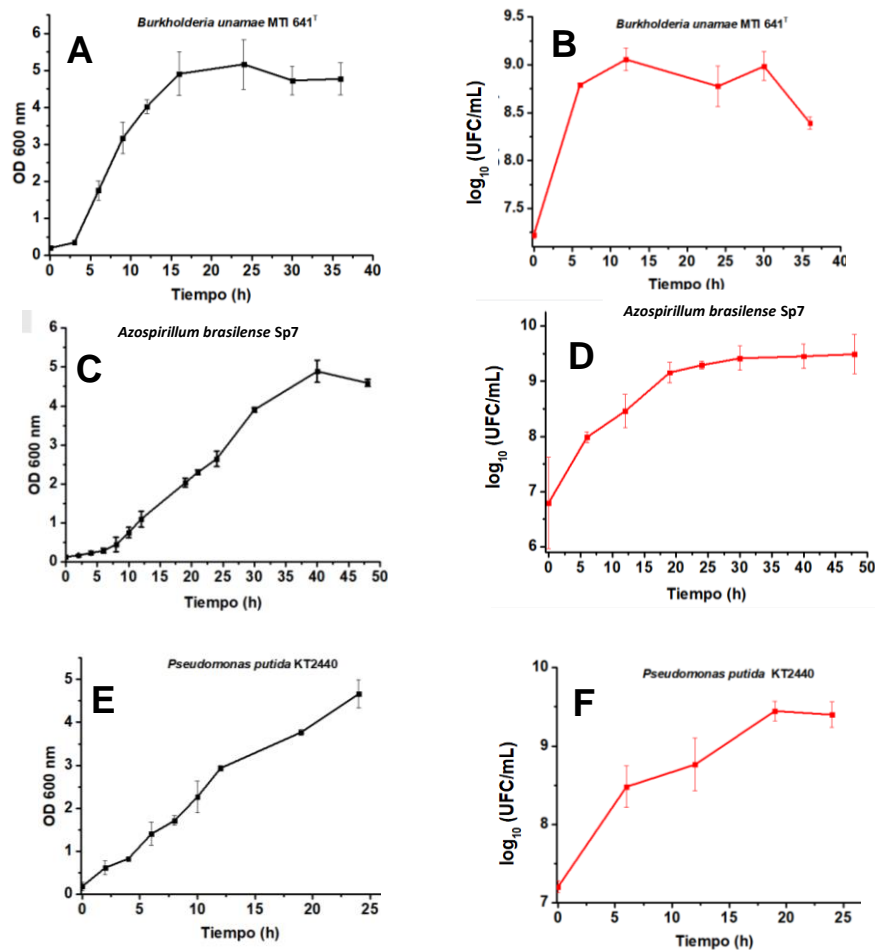


Figura 9. Curvas de crecimiento de la caracterización en matraz en el medio de producción con ácido succínico como fuente de carbono. *Burkholderia unamae* (A) Medición de la densidad óptica 600 nm (B) Medición de UFC/mL, expresada en log₁₀. *Azospirillum brasilense* (C) Medición de la densidad óptica 600 nm, (D) Medición de UFC/mL, expresada en log₁₀. *Pseudomonas putida* (E) Medición de la densidad óptica 600 nm. (F) Medición de UFC/mL, expresada en log₁₀.

Tabla 4. Productividades obtenidas en cultivos en matraces en el medio de producción con a. succínico

PRODUCTIVIDAD		
BACTERIA	log ₁₀ (UFC/mL)/h	Δ t (h)
KT2440	0.112 ± 0.01	19
Sp7	0.12 ± 0.05	19
MTI-641	0.15 ± 0.01	12

9.3.2 Caracterización de *Burkholderia unamae* MT1641^T, *Pseudomonas putida* KT2440 y *Azospirillum brasilense* Sp7 en biorreactor con ácido succínico.

La figura 10 muestra la caracterización de las tres bacterias en biorreactor crecidas en el medio de producción con ácido succínico como fuente de carbono. *Burkholderia unamae* MT1641^T alcanzó la fase estacionaria después de 12 h, tanto la densidad óptica como las ufc/mL no cambian después de ese tiempo (Figura 10G y H). La productividad máxima con succínico ($0.307 \pm 0.005 \log_{10}$ (UFC/mL)/h) en biorreactor fue ligeramente mayor que la obtenida con sacarosa $0.279 \pm 0.1 \log_{10}$ (UFC/mL)/h (Figura 7J). En la caracterización del crecimiento de *Pseudomonas putida* KT2440 en biorreactor con succínico se observó un comportamiento similar que con sacarosa, a las 6 h hay un incremento en la densidad óptica y luego cae substancialmente. Los problemas de producción de espuma por la alta velocidad de agitación y salida de medio de cultivo a través del venteo del reactor fueron similares a los descritos para sacarosa (Figura 5E y F). La máxima productividad con succínico en biorreactor a la hora 6 fue de $0.266 \pm 0.075 \log_{10}$ (UFC/mL)/h y para sacarosa en biorreactor de $0.154 \pm 0.038 \log_{10}$ (UFC/mL)/h. Estos resultados nos sugerían que podíamos usar succínico como fuente de carbono para *P. putida* KT2440 para la producción de co-cultivos. Respecto a *Azospirillum brasilense* Sp7, en la figura 10K se muestran las densidades ópticas y en la figura 10L las UFC/mL. La mayor densidad óptica fue de 5.4 en 12 h, después se mantuvo constante el resto del cultivo; no obstante el número de bacterias disminuye después de ese tiempo, lo cual fue inesperado. En los experimentos desarrollados por Morales-García, 2013, no se detectó a *Azospirillum brasilense* Sp 7 a los 10 dpi a partir de muestras de rizósfera de maíces inoculados con la mezcla de bacterias, pero si a los 20 dpi, por lo cual se propuso que la falla en detectarlo se debió a la complejidad de la muestra.

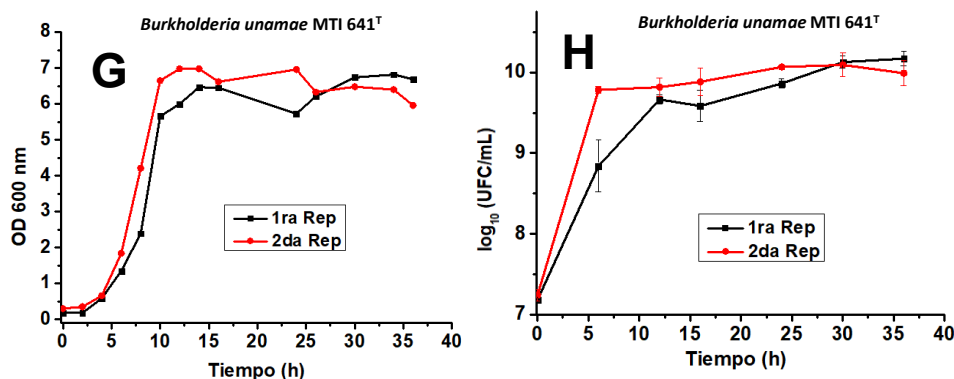


Figura 10. Curvas de crecimiento en biorreactor con el medio de producción con A. succínico como fuente de carbono. *Burkholderia unamae*: (G) Medición de la densidad óptica 600 nm y (H) Medición de UFC/mL, expresada en log₁₀. (Continúa siguiente página).

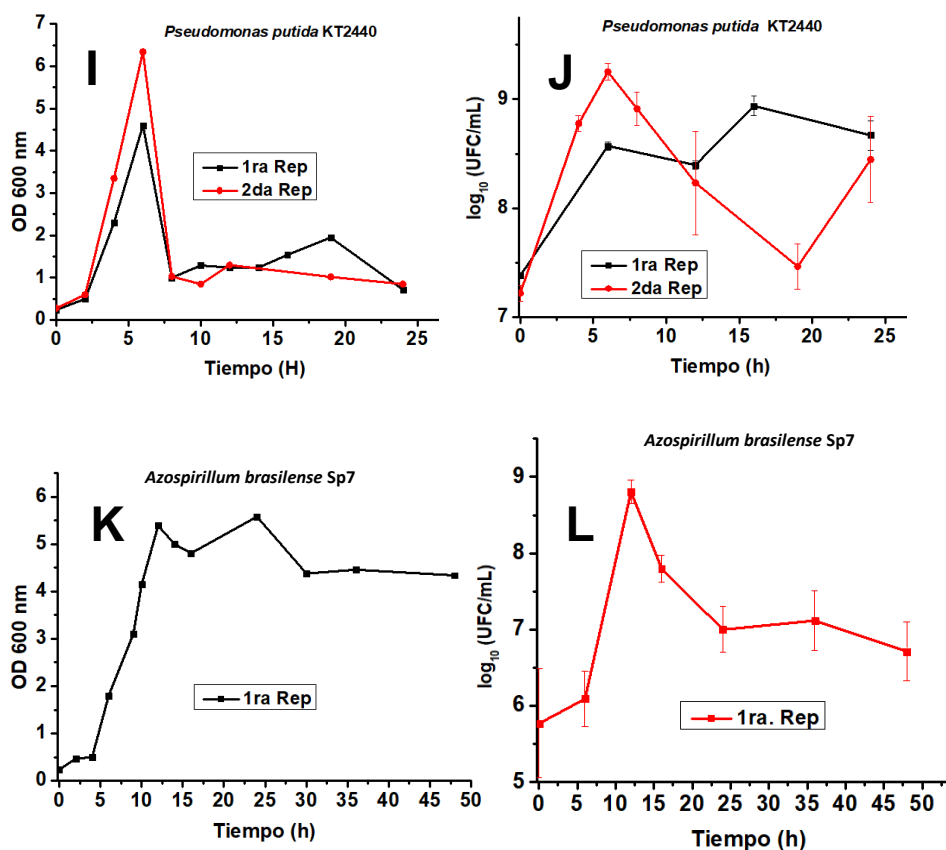


Figura 10(continuación). Curvas de crecimiento en biorreactor con el medio de producción con A. succínico como fuente de carbono. *Pseudomonas putida*: (I) Medición de la densidad óptica 600 nm y (J) Medición de UFC/mL, expresada en log₁₀. *Azospirillum brasilense*: (K) Medición de la densidad óptica 600 nm y (L) Medición de UFC/mL, expresada en log₁₀.

Tabla 5. Productividades obtenidas en cultivos en biorreactor con el medio de producción con a. succínico

PRODUCTIVIDAD		
BACTERIA	log ₁₀ (UFC/mL)/h	Δ t (h)
KT2440	0.266 ± 0.075	6
Sp7	0.133 ± 0.036	12
MTI-641	0.307 ± 0.005	12

9.4 Co-cultivos en biorreactor utilizando dos fuentes de carbono para disminuir la competencia por un mismo sustrato.

Después de crecer *B. unamae* MTI 641^T, *A. brasilense* Sp7 y *P. putida* KT2440 con ácido succínico como fuente de carbono en cultivos sumergidos en matraces y en biorreactor, se realizaron co-cultivos en biorreactor utilizando dos fuentes de carbono, sacarosa y ácido succínico. Considerando la similitud en cuanto al pH, tiempo de fermentación y preferencia

por la fuente de carbono, se propusieron los siguientes co-cultivos de dos bacterias. *Gluconacetobacter diazotrophicus* PAL5^T y *Burkholderia unamae* MT1641^T por su similitud en el pH de crecimiento (5.5). *Pseudomonas putida* KT2440 y *Sphingomonas* sp. OF178 fueron crecidas en co-inoculación por su similitud en el tiempo de fermentación (24 h). *Azospirillum brasilense* Sp7 con *Bradyrhizobium* sp. MS22, aunque no tienen un tiempo de fermentación similar, si crecían al mismo pH y *A. brasilense* Sp7 podía crecer con ácido succínico como fuente de carbono. Para la estrategia de co-cultivo se decidió inocular primero a la bacteria más lenta y un par de horas después a la más rápida, los tiempos de inoculación se describirán a detalle en cada apartado de las caracterizaciones en co-cultivo. Al igual que en la caracterización individual, se realizó la identificación molecular y morfológica de cada bacteria para poderlas contar.

9.4.1 Caracterización de *Azospirillum brasilense* Sp7 y *Bradyrhizobium* sp. MS22 en biorreactor con succínico y sacarosa.

La figura 11 muestra el crecimiento de la inoculación de las dos bacterias. La estrategia fue inocular primero a *Bradyrhizobium* sp. MS22 y en la hora 3 *A. brasilense* Sp7. Cuando se inoculó *A. brasilense* Sp7, se añadieron 5 g/L de ácido succínico. El equipo controló el pH en 7 utilizando H₂SO₄ 1M y NaOH 2M, En la figura 11A, se observa el incremento ordenado de las densidades ópticas respecto al tiempo, lo cual nos hacía suponer que se obtendría una alta productividad en UFC/mL. La figura 11B muestra el crecimiento de las bacterias expresado en log₁₀ de UFC/mL; la línea negra corresponde a *Bradyrhizobium* sp. MS22 y la roja a *Azospirillum brasilense* Sp7. En las primeras 12 h se observa el crecimiento de tres órdenes de magnitud de *Bradyrhizobium* sp. MS22 (10⁶ a 10⁹). Después de 9 h de haber co-inoculado a *Azospirillum brasilense* Sp7 se observó un incremento de un orden de magnitud (10⁶ a 10⁷) en el número de bacterias. Después de ese momento (12 h) los números de *Azospirillum brasilense* Sp7 parecen caer. A las mismas 12 h, *Bradyrhizobium* sp. MS22 entra en la fase estacionaria y coincide con el agotamiento de sacarosa en el medio de cultivo. Desafortunadamente no pudimos cuantificar el ácido succínico para saber si *A. brasilense* Sp7 no creció después de esa hora por un posible efecto inhibitorio por los metabolitos de

Bradyrhizobium sp. MS22, por el agotamiento de nutrientes o simplemente por la formación de agregados celulares de *Azospirillum brasilense* Sp7, lo cual impidió realizar el conteo correcto de UFC/mL. Para el conteo de bacterias en cada tiempo de muestreo se identificó cada microorganismo por morfología (figura 11.2) y se corroboró con la identificación molecular la presencia de *Azospirillum brasilense* Sp7 (figura 11.1). Para *Bradyrhizobium* sp. MS22 no se hizo prueba molecular porque su genoma no está secuenciado. Para corroborar el posible efecto inhibitorio de *Bradyrhizobium* sp. MS22 sobre *Azospirillum brasilense* Sp7, se realizaron experimentos en matraces en tres condiciones. **Condición 1:** se inoculó Sp7 desde el inicio y a las 6 h a MS22 con sacarosa como fuente de carbono. Sp7 creció bien hasta la hora 24 y entró en fase estacionaria con una productividad de $0.136 \log_{10}$ (UFC/mL)/h. MS22 no creció de las 6 a las 24 h, una vez que Sp7 entró en fase estacionaria (24 h), los números de MS22 aumentaron en dos órdenes de magnitud. **Condición 2:** se inocularon ambas bacterias desde inicio con las dos fuentes de carbono (sacarosa y succínico) a pH 7. Ambas bacterias crecen bien, MS22 entra en fase estacionaria a las 16 h con una productividad de $0.070 \log_{10}$ (UFC/mL)/h y Sp7 entra en fase estacionaria a las 24 h con una productividad de $0.161 \log_{10}$ (UFC/mL)/h. **Condición 3:** se inocularon ambas bacterias desde inicio con sacarosa como fuentes de carbono a pH 7. Ambas bacterias crecen bien, MS22 entra en fase estacionaria a la hora 18, al igual que en la condición 2, con una productividad de $0.078 \log_{10}$ (UFC/mL)/h y Sp7 entra en fase estacionaria a las 24 h con una productividad de $0.118 \log_{10}$ (UFC/mL)/h. Estos resultados sugieren que usando sacarosa e inoculando desde el principio ambas bacterias se obtienen números adecuados de bacterias y se mitigan los posibles efectos inhibitorios (anexo 12. 4 y 12.6)

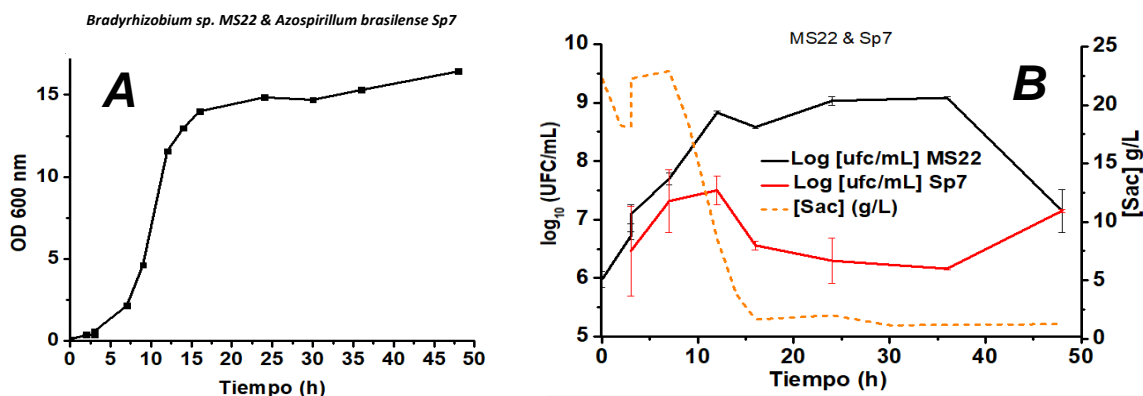


Figura 11 Curva de crecimiento de la co-inoculación de *Bradyrhizobium* sp. MS22 & *Azospirillum brasilense* Sp7 en Medio de Producción con sacarosa y ácido succínico como fuente de carbono.

- Medición de la densidad óptica 600 nm con respecto al tiempo.
- Medición de UFC/mL, expresada en \log_{10} y concentración de sacarosa con respecto al tiempo.

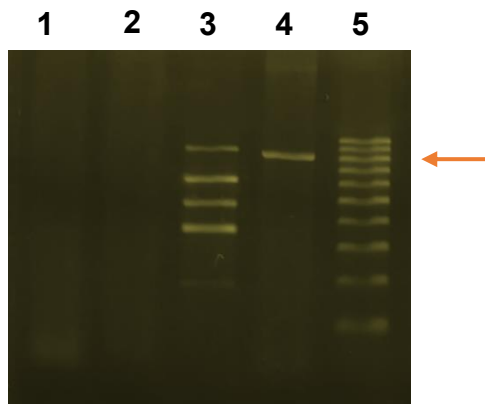


Figura 11.1 Amplificación de gen *laf1* de *Azospirillum brasilense* Sp7 mediante PCR de colonia proveniente de la co-inoculación en biorreactor. Gel de agarosa al 2%; marcador de 100 a 1000 pb. Peso esperado de 925 pb. Carril 1: control negativo (palillo), Carril 2: Control negativo (*E. coli* DH5 α), Carril 3: Control positivo proporcionado por Vivanco-Calixto, Carril 4: **PCR de colonia proveniente de la co-inoculación en biorreactor de Sp7**, Carril 5: Marcador

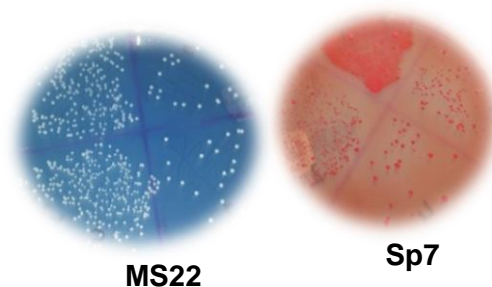


Figura 11.2 Crecimiento de *Bradyrhizobium* sp. MS22 y *Azospirillum brasilense* Sp7 proveniente de la co-inoculación en biorreactor.

9.4. 2 Caracterización de *Sphingomonas* sp. OF178 y *Pseudomonas putida* KT2440 en biorreactor con succínico y sacarosa.

La figura 12 nos muestra las gráficas de la co-inoculación de *Sphingomonas* sp. OF178 y *Pseudomonas putida* KT2440. La primera bacteria inoculada fue OF178 con sacarosa como fuente de carbono; a las 6 h se co-inocula a KT2440 y se agregan 5g/L de ácido succínico. El biorreactor controló el pH en 7. Al co-inocular se observó el aumento de una densidad óptica (figura 12C). De las 12 a las 16 h hay una caída de siete densidades, este comportamiento es el observado en las primeras seis horas de la caracterización individual de KT2440 La figura 12D muestra el \log_{10} de ufc/mL. La línea negra corresponde a OF178 y la roja a KT2440. En las primeras 6 h OF178 incrementa un orden de magnitud (10^8 a 10^9); no obstante, al co-inocular a KT2440, se observa una caída en las UFC/mL de *Sphingomonas* sp. OF178. Conforme *P. putida* kt2440 crece, los números de *Sphingomonas* sp. OF178 caen. Esto puede indicar dos situaciones; un fenómeno de inhibición causado por *Pseudomonas putida* KT2440, o la adaptación de *Sphingomonas* sp. OF178 a la presencia de ácido succínico, ya que el pH disminuye de 7.09 a 6.3 unidades por la adición del ácido succínico y el biorreactor lo regresa a 7 después de 5 min. No obstante, pareciera que después de las 12 h vuelve a crecer. El mayor consumo de sacarosa se da en las primeras ocho horas,

manteniéndose de las 8 a las 24 h en 10 g/L. En la identificación molecular (figura 12.1) solo se pudo amplificar el fragmento que identifica a *Pseudomonas putida* KT2440, sin embargo por morfología si se logró identificar ambas bacterias (figura 12.2).

Con el fin de descartar la toxicidad del ácido succínico, se realizó un ensayo en matraces inoculando *Sphingomonas* con dicho ácido como fuente de carbono y el pH se ajustó en 7 antes de inocular. La bacteria creció dos órdenes de magnitud en 24 h, lo que indica que el succínico no es tóxico para *Sphingomonas*. Otro experimento en matraz se realizó co-inoculando ambas bacterias desde el inicio con las dos fuentes de carbono, experimento en el cual se observó incremento en el número de bacterias con productividades de $0.104 \log_{10}$ (ufc/mL)/h para *Sphingomonas* a la 12 h y de $0.178 \log_{10}$ (ufc/mL)/h para *Pseudomonas* a las 6 h. Resultados similares se obtuvieron cuando se co-inoculan ambas bacterias desde el inicio con sacarosa como fuente de carbono a pH 7; con productividades de $0.103 \log_{10}$ (ufc/mL)/h para *Sphingomonas* a las 12 h y de $0.219 \log_{10}$ (ufc/mL)/h para *Pseudomonas* a las 6 h. Finalmente se evaluó otra condición con sacarosa como fuente de carbono, inoculando desde el inicio a *Sphingomonas* y 6 h después *Pseudomonas*. *Sphingomonas* creció bien con una productividad de $0.114 \log_{10}$ (ufc/mL)/h, mientras que *Pseudomonas* permaneció sin crecimiento (en fase “lag”) por 10 h y una vez que *Sphingomonas* entró en fase estacionaria, *Pseudomonas* comenzó a crecer con una productividad de $0.058 \log_{10}$ (ufc/mL)/h. Con estos resultados sugerimos que la mejor condición es inocular ambas bacterias desde el inicio utilizando sacarosa como fuente de carbono (anexo 12.5 y 12.6)

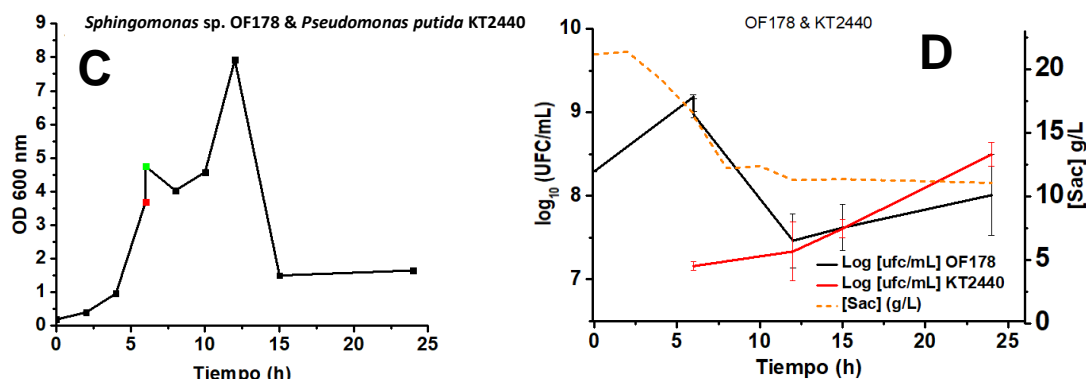


Figura 12 Curva de crecimiento de la co-inoculación de *Sphingomonas* sp. OF178 & *Pseudomonas putida* KT2440 en Medio de Producción con sacarosa y ácido succínico como fuente de carbono.

C. Medición de la densidad óptica 600 nm con respecto al tiempo.

D. Medición de UFC/mL, expresada en \log_{10} y concentración de sacarosa con respecto al tiempo.

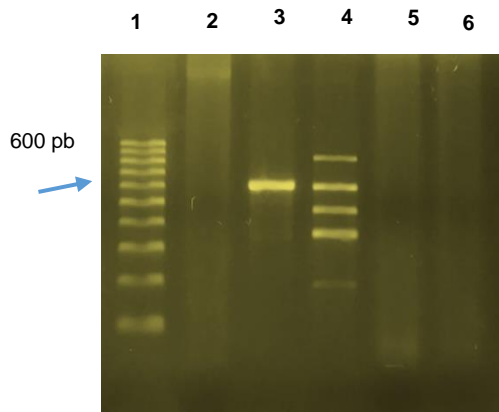


Figura 12.1. Amplificación del gen *fliM* de *Pseudomonas putida* KT2440 y 16S de OF178 mediante PCR de colonia proveniente de biorreactor. Gel de agarosa al 2%; marcador de 100 a 1000 pb. Peso esperado de 643 pb. Carril 1: Marcador, Carril 2: PCR de colonia proveniente de biorreactor de OF178, Carril 3: **PCR de colonia proveniente de biorreactor de KT2440**, Carril 4: Control positivo proporcionado por Vivanco-Calixto, Carril 5: Control negativo KT2440 (*E. coli* DH5 α). Carril 6: Control negativo OF178 (*E. coli* DH5 α)

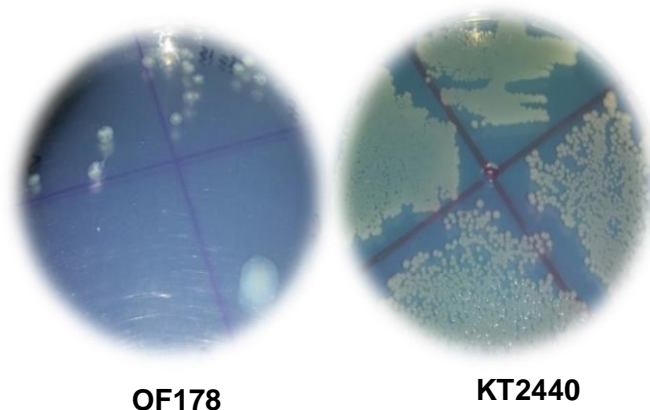


Figura. 12.2 Crecimiento de *Sphingomonas* sp. OF178 & *Pseudomonas putida* KT2440 proveniente de la co-inoculación en biorreactor.

9.4.3 Caracterización de *Gluconacetobacter diazotrophicus* PA15^T y *Burkholderia unamae* MT1641^T

La caracterización de co-cultivos utilizando estas dos últimas bacterias nos dieron resultados satisfactorios. La figura 13E muestra el comportamiento en densidades ópticas y la figura 13F, el comportamiento del \log_{10} de UFC/mL. La estrategia de inoculación fue inocular primero a *G. diazotrophicus* PA15^T y a las 8 h a *Burkholderia unamae* MT1641^T con la adición de 5 g/L de ácido succínico y control de pH de 5.5 con NaOH 0.1 M y H₂SO₄ 0.1 M. La mayor densidad óptica fue de 14 en 48 h. Ambas bacterias presentan un incremento en número de tres órdenes de magnitud sin ningún efecto inhibitorio apreciable después de co-inocularlas. En este caso, se requieren 24 h para obtener los mayores números de bacterias, ambas llegan en un orden de 10⁹ UFC/mL. Después de 30 h se deja de consumir sacarosa y su concentración permaneció constante. Sólo se realiza la identificación morfológica para cada bacteria (figura 13.1)

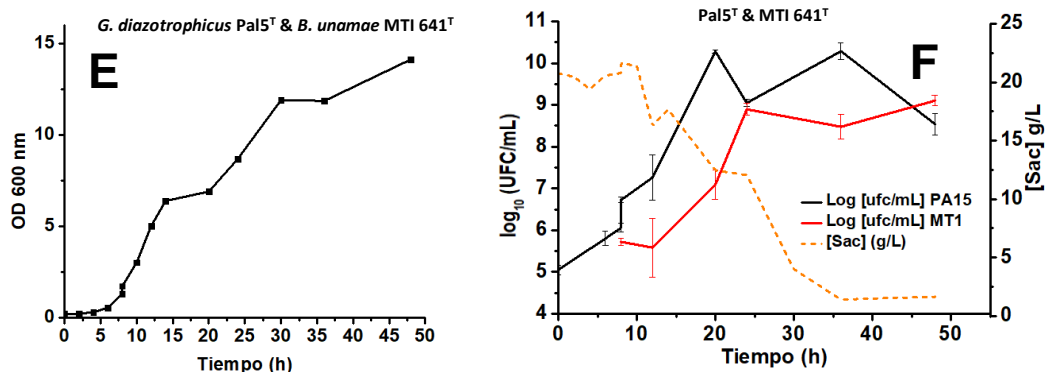


Figura 13 Curva de crecimiento de la co-inoculación de *Gluconacetobacter diazotrophicus* Pal5^T & *Burkholderia unamae* MTI 641^T en medio para biorreactor con sacarosa y ácido succínico como fuente de carbono.

- E. Medición de la densidad óptica 600 nm con respecto al tiempo.
 F. Medición de UFC/mL, expresada en log₁₀ con respecto al tiempo.

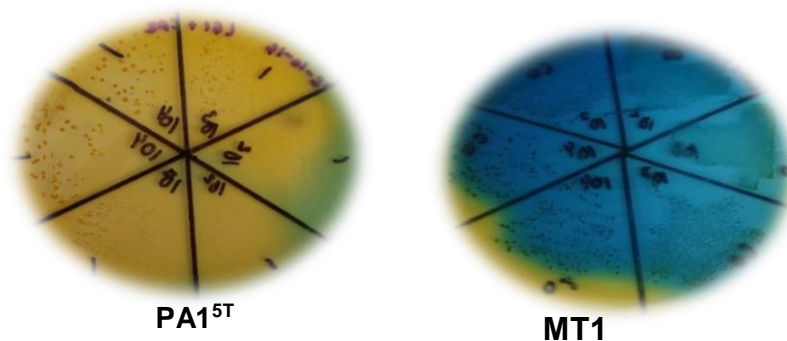


Figura 13.1 Crecimiento de *Gluconacetobacter diazotrophicus* Pal5^T y *Burkholderia unamae* MTI 641^T proveniente de la co-inoculación en biorreactor.

La estrategia de co-inoculación utilizando dos fuentes de carbono y tiempos de inoculación diferente no resultó exitosa, excepto para el co-cultivo de *Gluconacetobacter diazotrophicus* Pal5^T y *Burkholderia unamae* MTI 641^T. Inoculando ambas bacterias desde el inicio y usando sacarosa como fuente de carbono resultó prometedor para la estrategia de co-inoculaciones duales. No obstante, se desconocía si tres bacterias crecerían con sacarosa inoculándolas desde el inicio. De ser así, se simplificaría aún más el proceso de producción masiva del inoculante multi-especies.

9.5 Evaluación de co-inoculaciones de tres bacterias con sacarosa como fuente de carbono.

Con la idea de abatir costos de producción del inoculante multi-especies se exploró la posibilidad de co-inocular tres bacterias al mismo tiempo utilizando sacarosa como fuente de carbono. Se decidió crecer juntas a *Azospirillum brasilense* Sp7, *Pseudomonas putida* KT2440 y *Sphingomonas* sp. OF178 porque las tres crecen a pH 7. Por otro lado se sabía que *Gluconacetobacter diazotrophicus* Pal5^T y *Burkholderia unamae* MTI 641^T crecían a pH de 5.5 sin embargo se desconocía si *Bradyrhizobium* sp. MS22 sería capaz de crecer a ese valor de pH.

9.5.1 Caracterización del crecimiento de tres bacterias en co-cultivo en matraces agitados

Para realizar este experimento, se prepararon pre-inóculos y placas Petri con medio selectivo para cada una de las bacterias. Todas las co-inoculaciones se ajustaron para que cada una de las bacterias tuviera una densidad óptica inicial de 0.1 en un volumen de 100 mL, 30 °C y 180 rpm. El conteo de UFC/mL se realizó igual que en los experimentos anteriores. Se platearon las últimas tres diluciones ($10^{-(2-4)}$, $10^{-(3-5)}$, $10^{-(4-6)}$, dependiendo de la hora de toma de muestra), tomando de un mismo tubo eppendor la cantidad de 20 μ L de muestra para platear por triplicado cada bacteria evaluada en co-inoculación. Durante la caracterización se midió pH. Ambos experimentos se realizan por triplicado. La figura 14A y B corresponden a la co-inoculación de *Gluconacetobacter diazotrophicus* Pal5^T, y *Burkholderia unamae* MTI 641^T y *Bradyrhizobium* sp. MS22 en el medio de producción con sacarosa a pH de 5.5. En la figura 14A se observa el comportamiento en densidades ópticas, donde la máxima densidad alcanzada fue de 8 en 48 h. El incremento en el número de bacterias en UFC/mL se observa favorable para las tres bacterias, aunque la predominante fue MTI641^T ya que incrementó tres órdenes de magnitud (10^7 a 10^9), seguida de MS22 (10^6 a 10^8) y Pal5^T (10^7 a 10^8). En un proceso de producción masiva con estas tres bacterias se requerirán solo 24 horas para alcanzar los números máximos de estas bacterias. De la hora 24 hasta la hora 48 se observa la fase estacionaria de cada bacteria. Las productividades alcanzadas fueron de 0.077 ± 0.01 , 0.06 ± 0.01 y $0.12 \pm 0.2 \log_{10}$ (UFC/mL)/h para *Bradyrhizobium* sp. MS22,

Gluconacetobacter diazotrophicus Pal5^T y *Burkholderia unamae* MTI 641^T respectivamente (cálculo estimado en 18 h). Respecto al pH, este incrementó ligeramente las primeras 18 h (de 5.5 a 6), posteriormente se observa su caída conforme transcurre el tiempo (de 6 a 4.6). La segunda caracterización de co-inoculación de tres bacterias corresponde a *Azospirillum brasilense* Sp7, *Pseudomonas putida* KT2440 y *Sphingomonas* sp. OF178. El pH del medio inicial fue de 7. La mayor densidad óptica que se obtuvo fue de 8 en 36 h, aunque en las primeras 24 h llega a 6 densidades (figura 14C). Se observa crecimiento en UFC/mL para las tres bacterias (figura 14D), donde el incremento fue de una orden de magnitud para cada bacteria (10^6 a 10^7 para Sp7, 10^7 a 10^8 para KT2440 y 10^8 a 10^9 para OF178), siendo las productividades de 0.12 ± 0.03 para KT2440, 0.11 ± 0.03 para OF178 y $0.14 \pm 0.07 \log_{10}$ (UFC/mL)/h para Sp7 (cálculo realizado en 16 h). Todos los pre-inóculos se preparan en los tiempos estipulados de cada bacteria (24,36 y 48 h); sin embargo, no se inicia con el mismo número de bacterias en UFC/mL porque el volumen de inóculo se estimó en base a la densidad óptica, que no necesariamente correlaciona con el número de bacterias. Este comportamiento de bacterias se observó también durante la caracterización individual en matraces (apartado 9.1). En la figura 14D se puede observar que después de 24 h todas las bacterias se encuentran en fase estacionaria, por lo que es posible que sólo se requieran 24 h para alcanzar los números máximos de bacterias en un futuro proceso de producción masiva en biorreactor. El pH incrementó las primeras 8 h (de 7 a 7.5), después se mantuvo en 6.8 hasta las 24 h. Este comportamiento de pH en ambos experimentos pudiera sugerir algún tipo de interacción entre las bacterias en co-cultivo, ya que de manera individual todas alcalinizaron el medio, excepto *Bradyrhizobium* sp. MS22 que se mantuvo en 6.8-7.0 y *Gluconacetobacter diazotrophicus* Pal5^T en LGI acidificó (de 5.5 a 4.8).

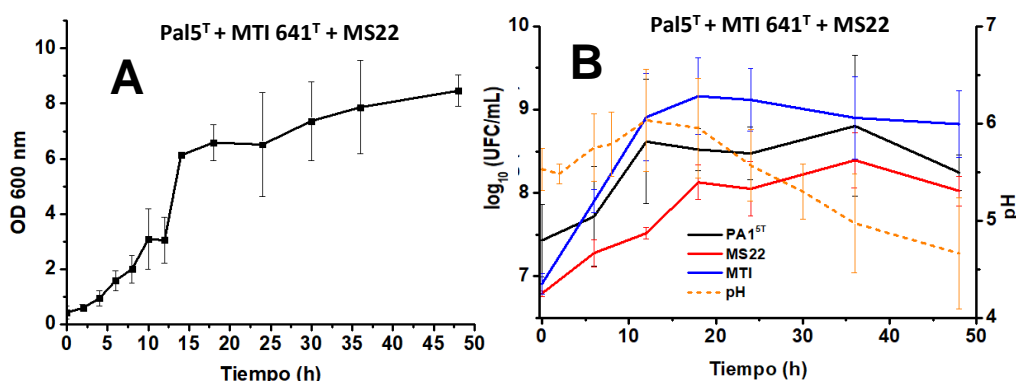


Figura 14. Curvas de crecimiento de la co-inoculación de tres bacterias en matraces con sacarosa como fuente de carbono. **A:** Medición de la densidad óptica 600 de *Gluconacetobacter diazotrophicus* Pal5^T & *Burkholderia unamae* MTI 641^T & *Bradyrhizobium* sp. MS22 en el medio de producción. **B:** Medición de UFC/mL, expresada en \log_{10} y pH. (Continúa en la siguiente página)

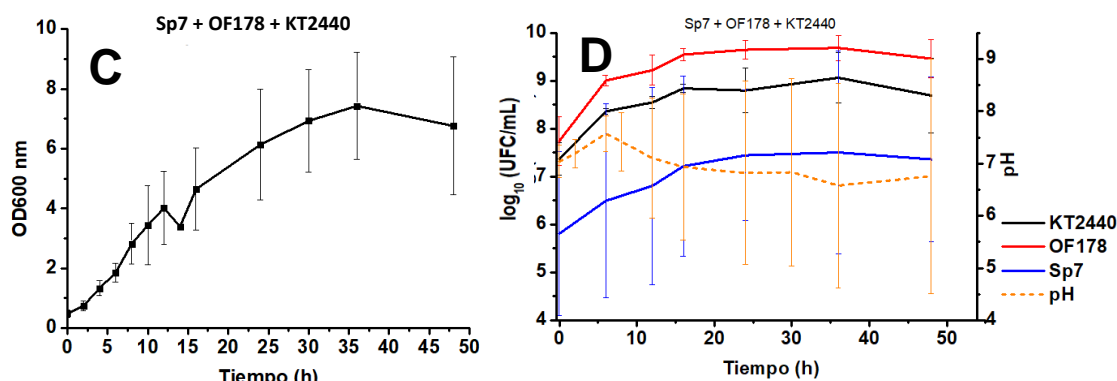


Figura 14 (continuación). Curvas de crecimiento de la co-inoculación de tres bacterias en matraces con sacarosa como fuente de carbono. **C:** Medición de la densidad óptica a 600 nm con respecto al tiempo de *Azospirillum brasilense* Sp7 & *Sphingomonas* sp. OF178 & *Pseudomonas putida* KT2440 en el medio de producción. **D:** Medición de UFC/mL, expresado en log₁₀ y pH.

9.5.2 Caracterización en biorreactor

Debido a los prometedores resultados obtenidos en matraz, procedimos a realizar las co-inoculaciones de tres bacterias en biorreactor. La estrategia de inoculación y toma de muestra fue similar al experimento realizado en matraces.

9.5.2.1 Caracterización del crecimiento de co-cultivo de *Azospirillum brasilense* Sp7, *Sphingomonas* sp. OF178 y *Pseudomonas putida* KT2440 en biorreactor

En la figura 15E se presenta la medición en densidades ópticas y en la figura 15F y G el log₁₀ de ufc/mL de *Azospirillum brasilense* Sp7, *Sphingomonas* sp. OF178 y *Pseudomonas putida* KT2440 de la primera y segunda repetición del experimento. Los valores de densidad óptica y curvas de crecimiento en UFC/mL de las dos repeticiones fueron similares. De acuerdo a los resultados de las figuras 15F, se puede observar el incremento de cuatro órdenes de magnitud para *A. brasilense* Sp7 (2.82×10^4 a 1×10^8) y tres para *Sphingomonas* sp. OF178 (3.16×10^7 a 1.58×10^{10}) y dos para *Pseudomonas putida* KT2440 (2.51×10^7 a 5.62×10^9). Números similares se obtuvieron en la segunda repetición (figura 15G). Las máximas productividades se presentan en las tres bacterias a las 12 h, siendo de 0.16 ± 0.005 para OF178, 0.15 ± 0.09 para KT2440 y 0.15 ± 0.04 para Sp7; sin embargo podemos observar que para *A. brasilense* Sp7 se requieren las 24 h para llegar al máximo número de bacterias, por

lo que el tiempo global de fermentación de esta co-inoculación se realizaría en 24 h. Las productividades a las 24 h son las siguientes: 0.1 ± 0.02 para OF178, 0.1 ± 0.01 para KT2440 y 0.14 ± 0.2 para Sp7. Al comparar con la productividad obtenida en matraz de las tres bacterias co-inoculadas, esta resulta ser similar (0.11 ± 0.03 para OF178, 0.12 ± 0.3 para KT2440 y 0.14 ± 0.07 para Sp7). Cabe mencionar que el pH de esta co-inoculación tiende a alcalinizarse y para controlar el pH en 7 se tuvo que adicionar H_2SO_4 1 M mediante el sistema de control del biorreactor, no obstante el gasto de ácido fue mínimo. La sacarosa no se consume totalmente, 10 g/L, remanentes permanecen en el medio después de 48 h de cultivo. Estos resultados confirman que se puede tener una producción masiva de inoculante multi-especies en fermentaciones de 24 h en biorreactor. Se realizó también la caracterización molecular y morfológica, obteniendo los resultados esperados para cada bacteria (figura 15.1 y 15.2)

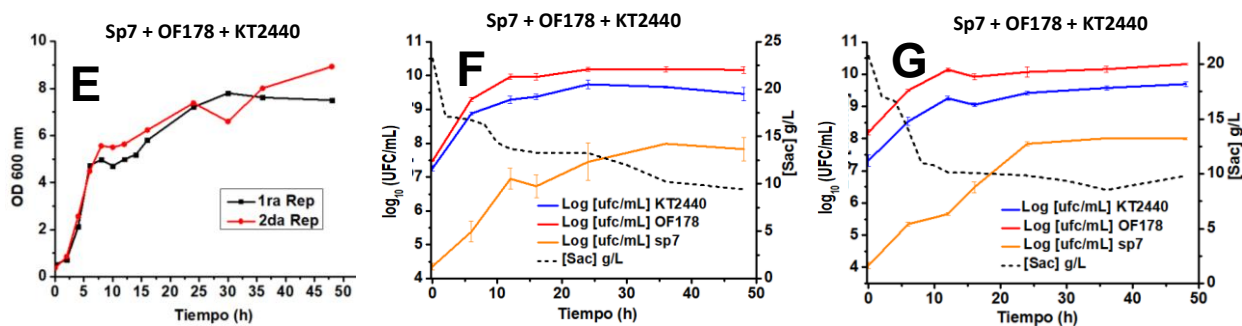


Figura 15 Curvas de crecimiento de la co-inoculación de tres bacterias en biorreactor de *Azospirillum brasilense* Sp7 & *Sphingomonas* sp. OF178 & *Pseudomonas putida* KT2440 en el medio de producción a pH de 7. E: Medición de la densidad óptica 600 nm. F: Primera repetición: medición de UFC/mL, expresada en \log_{10} y concentración de sacarosa. G: Segunda repetición: medición de ufc/mL, expresada en \log_{10} y concentración de sacarosa.

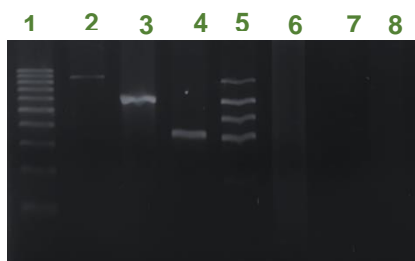


Fig. 15.1 Caracterización molecular de la co-inoculación de Sp7, OF178 y KT2440. Gel de agarosa al 2%; marcador de 100 a 1000 pb. Carril 1: Marcador, Carril 2: *laf1* Sp7 (925 pb); Carril 3: *flhM* KT2440 (643 pb); Carril 4: 16s OF178 (376 pb); Carril 5: Control positivo (proporcionado por Vivanco-Calixto); Carril 6, 7 y 8: Controles negativos de Sp7, KT2440 and OF178 respectivamente.

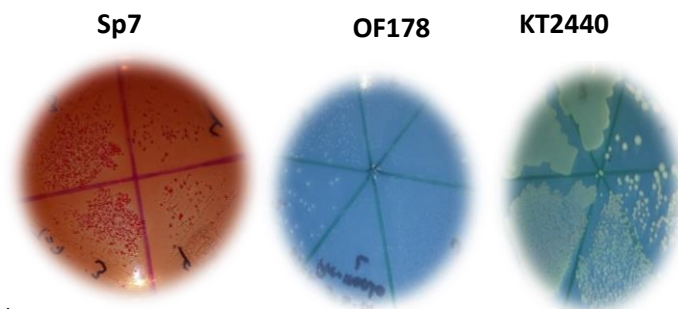


Fig. 15.2. Caracterización morfológica de Sp7, OF178 y KT2440.

9.5.2.2 Caracterización de *Gluconacetobacter diazotrophicus* PA15^T, *Burkholderia unamae* MT1641^T y *Bradyrhizobium* sp. MS22 en co-cultivo en biorreactor.

La caracterización de *Gluconacetobacter diazotrophicus* PA15^T, *Burkholderia unamae* MT1641^T y *Bradyrhizobium* sp. MS22 se realizó a pH 5.5. La figura 16 contiene las mediciones de densidades ópticas (figura 16H), y ufc/mL de la primera (figura 16I) y segunda repetición (figura 16J). Con lo que respecta al log₁₀ de ufc/mL, la bacteria que predominó fue *Burkholderia unamae* MTI 641^T, y en la segunda repetición por ejemplo, esta bacteria incrementó en casi cuatro órdenes de magnitud (3.16×10^6 a 1×10^{10}); *Gluconacetobacter diazotrophicus* Pal5^T y *Bradyrhizobium* sp. MS22 incrementaron en uno y dos órdenes de magnitud (3.02×10^7 a 5.01×10^8 y 1×10^6 a 6.31×10^8), respectivamente. Las mayores productividades para este caso fueron de 0.1 ± 0.001 log₁₀ (UFC/mL)/h para PA15^T, 0.15 ± 0.28 log₁₀ (UFC/mL)/h para MS22 y 0.25 ± 0.01 log₁₀ (UFC/mL)/h para MTI641^T. Para controlar pH se utilizó H₂SO₄ y NaOH 0.1 M. En las figuras 16I-J se observa el consumo de sacarosa, el cual se agotó en las primeras 24 h. Es posible que exista un factor limitante el cual no es sacarosa porque entre las 12 y 18 h todas las bacterias entran a fase estacionaria y todavía hay sacarosa. La caracterización molecular y morfológica resultó satisfactoria (figura 16.1 y 16.2).

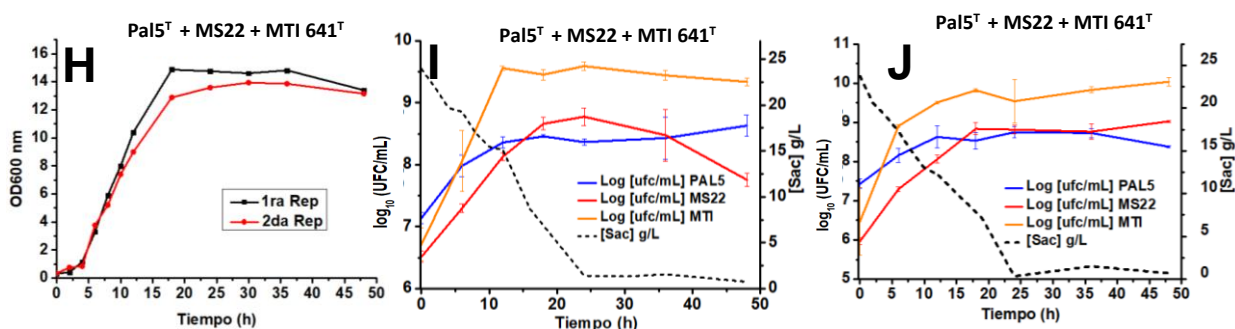


Figura 16 Curvas de crecimiento de la co-inoculación de tres bacterias en biorreactor de *Gluconacetobacter diazotrophicus* PA15^T & *Burkholderia unamae* MTI 641^T & *Bradyrhizobium* sp. MS22 en el medio de producción a pH de 5.5. H: Medición de la densidad óptica 600 nm. I: Primera repetición: medición de UFC/mL, expresada en log₁₀ y concentración de sacarosa. J: Segunda repetición: medición de UFC/mL, expresada en log₁₀ y concentración de sacarosa

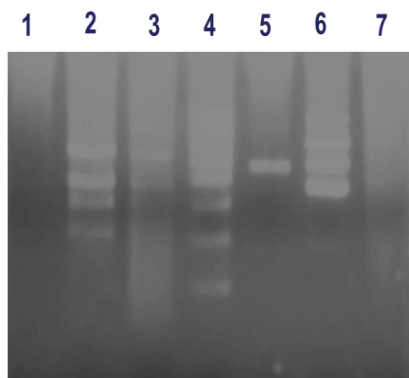


Figura 16.1. Caracterización molecular de de la co-inoculación de PA15, MTI y MS22. Gel de agarosa al 2%, Marcador de 100 a 1000 pb. Carril 1: Control negativo para MTL641, Carril 2: Control positivo para MTL digerida con la enzima Hha1. **Carril 3: Muestra de colonia de la co-inoculación digerida con Hha1 para MTL.** Carril 4: Marcador, Carril 5: *adh* de PA15^T (495 pb), Carril 6, Control positivo de PA15^T (Proporcionado por Vivanco-Calixto); Carril 7: Control negativo para PA15^T (*E. coli* DH5 α).

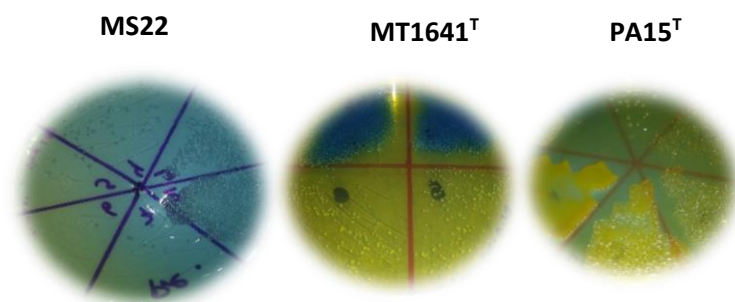


Figura 16.2 Caracterización morfológica de MS22, MT1641 y PA15

Con estos resultados se logró reducir el número de fermentaciones a realizar en biorreactor para la producción masiva del inoculante multi-especies, de seis (si se propagaran en forma individual) a dos (haciendo co-inoculaciones de tres). Los resultados de estas dos últimas caracterizaciones de crecimiento mediante co-cultivos de tres bacterias en biorreactor parecen ser prometedores para la futura producción masiva del inoculante multi-especies. Si bien es cierto que existen patentes de inoculantes polimicrobianos (Reddy, Lalithakumari, 2014) a partir de compostas o consorcios indefinidos, es importante resaltar que dichos desarrollos no cuentan con métodos para identificar y por tanto cuantificar cada una de las cepas que contienen sus formulaciones. En este trabajo además de la producción masiva, se implementó un método de análisis de calidad utilizando herramientas moleculares y medios selectivos para el aseguramiento de la producción de las bacterias de interés libre de microorganismos contaminantes.

9.6 Análisis de metabolitos producidos por las bacterias utilizando cromatografía líquida (HPLC).

La siguiente etapa de la caracterización del crecimiento de las bacterias del EMMIM-1 en co-cultivos con tres bacterias en biorreactor fue analizar los metabolitos producidos tanto de co-cultivos como en la propagación individual. El análisis se enfocó en la cuantificación de ácidos orgánicos presentes en las muestras de fermentación, además nos interesaba saber si las bacterias producen la misma clase de metabolitos cuando se propagan de forma individual y cuando se propagan juntas. De cada cinética en biorreactor se guardó 1 mL de sobrenadante de caldo de fermentación a -20 °C. Esos sobrenadantes se centrifugaron dos veces más a 13000 rpm por 10 min antes del análisis en el HPLC. Los ácidos orgánicos que se analizaron fueron ácido oxálico, cítrico, málico, succínico, fórmico, acético, láctico, benzoico, e indol acético (anexo 12.8). Es importante mencionar que existieron algunos metabolitos que no pudimos identificar porque no coincidían con los tiempos de retención de los estándares, pero que posiblemente se trate de metabolitos con grupos aldehído y carboxilo ya que observamos picos con el detector de luz UV a 210 nm. Sólo se analizó una réplica de cada cinética correspondiente a los tiempos en los cuales se realizó el conteo de UFC/mL.

9.6.1 Comparación de metabolitos producidos en Co-inoculación vs Individual de *Gluconacetobacter diazotrophicus* Pal5T, *Burkholderia unamae* MTI 641^T y *Bradyrhizobium* sp. MS22.

Los ácidos orgánicos producidos por rizobacterias son compuestos de bajo peso molecular de dos o más carbonos, entre los que se encuentran: oxálico, cítrico, malónico, láctico, succínico, málico, glucónico, acético, glicónico, fumárico, adípico, indol acético y dos-cetoglucónico (Paredes-Mendoza y Espinosa-Victoria 2010). *Gluconacetobacter diazotrophicus* oxida la glucosa y produce gluconato en el periplasma mediante la enzima PQQ-GHD (pirroloquinolina-quinona –alcohol deshidrogenasa) (Luna et al. 2006), aunque también produce ácido indol acético, y debido a que presenta *quorum sensing*, produce

diferentes n-acil-homoserina lactonas. *Burkholderia cepacea* también es capaz de oxidar la glucosa y producir glucónico y 2-cetoglucónico (Song et al. 2008). La figura 17 muestra los cromatogramas comparando las horas 0, 6, 12, 24 y 48 de co-cultivos vs cultivos individuales. En cada imagen es posible visualizar que algunos metabolitos (inferido por los picos) que se producen cuando las bacterias crecen en forma individual no se producen cuando están juntas. En la hora 6 por ejemplo, el pico que produce MS22 con tiempo de retención de 19.3 min no lo produce cuando está en co-inoculación. En las condiciones de cultivo evaluadas, no se detectó ningún pico relacionado con acético, fórmico, láctico, indol-acético, benzoico, o cítrico.

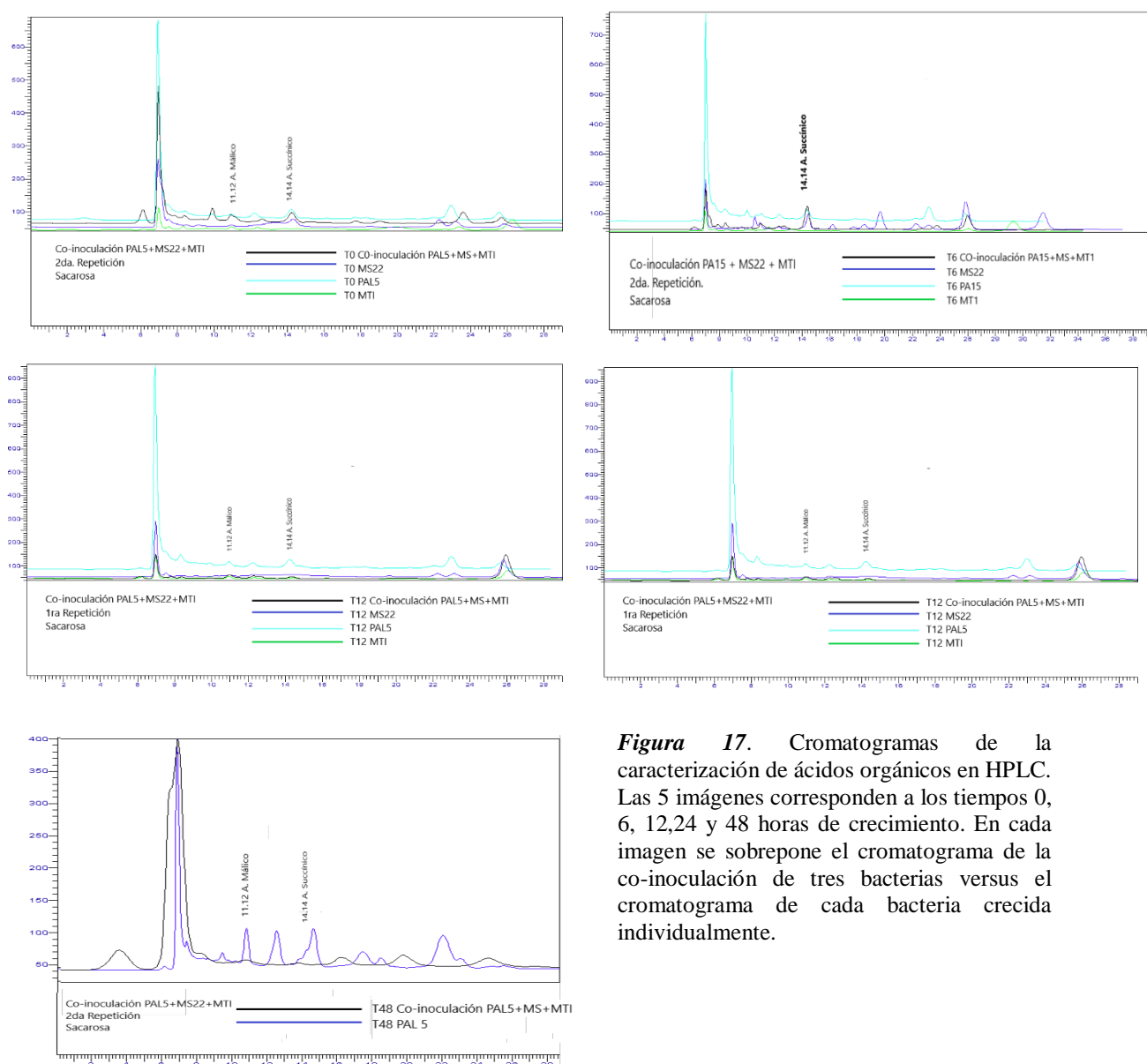


Figura 17. Cromatogramas de la caracterización de ácidos orgánicos en HPLC. Las 5 imágenes corresponden a los tiempos 0, 6, 12, 24 y 48 horas de crecimiento. En cada imagen se sobrepone el cromatograma de la co-inoculación de tres bacterias versus el cromatograma de cada bacteria crecida individualmente.

9.6.2 Comparación de metabolitos producidos en Co-inoculación vs Individual de *Azospirillum brasilense* Sp7, *Sphingomonas* sp. OF178 y *Pseudomonas putida* KT2440.

Azospirillum sp. produce fitohormonas como el ácido-3-indol acético (AIA), ácido-3-indol butírico (ABA), indol-3-etanol (TOL), ácido-3-indol láctico (ILA), ácido-3-indol pirúvico (IPyA), ácido-3-indol propiónico (IPA), cinetina, ácido giberelico (GA3), ácido salicílico (SA) y ácido jasmónico (JA) (Fukami et al. 2017). *Pseudomonas putida* produce metabolitos como indol-3-acetaldeido, ácido indól láctico, ácido indól propiónico, ácido indól butírico (Damam et al. 2016), piruvato, succinato, citrato, salicilato, alcohol bencílico, benzaldehído y benzoato (Basu et al. 2009). Sólo algunos picos relacionados con los metabolitos que se citaron se observaron, (figura 18) como lo es el ácido málico y succínico. En las primeras 6 h es cuando más se observa la aparición de picos, indicando una mayor excreción de metabolitos.

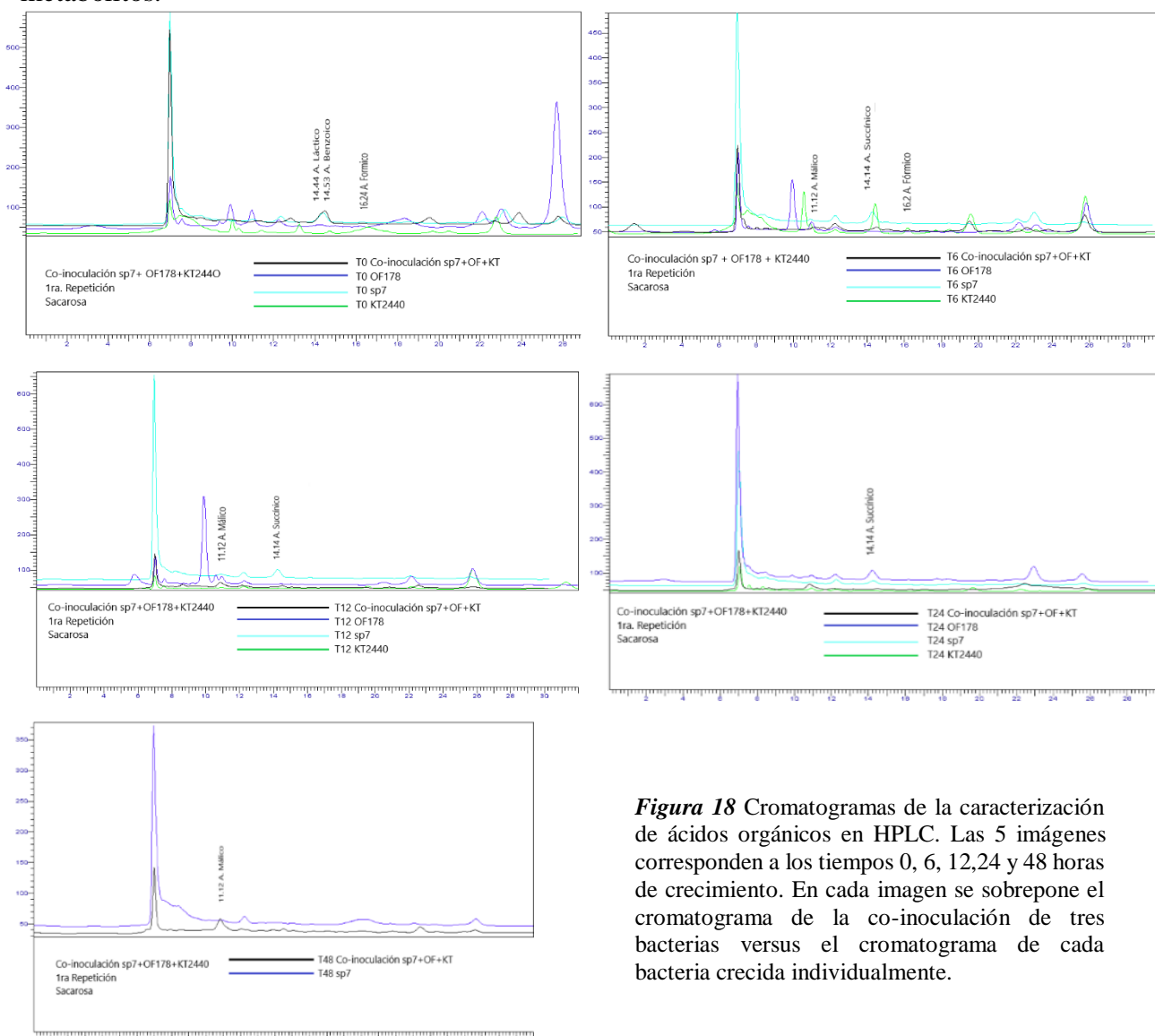


Figura 18 Cromatogramas de la caracterización de ácidos orgánicos en HPLC. Las 5 imágenes corresponden a los tiempos 0, 6, 12, 24 y 48 horas de crecimiento. En cada imagen se sobrepone el cromatograma de la co-inoculación de tres bacterias versus el cromatograma de cada bacteria crecida individualmente.

Estos resultados sugieren que si existe diferencia en la producción de metabolitos en los cultivos individuales respecto a los co-cultivos de tres bacterias. Existen metabolitos que no pudimos detectar, por ejemplo el AIA, el cual se detecta a una longitud de onda diferente (250 nm), y para detectarlo se debe realizar una extracción con etil-acetato; además, la bacteria debe crecerse en medios suplementados con triptófano por 5-6 días.

10. CONCLUSIONES

Durante el desarrollo de este trabajo se encontró el medio y las condiciones donde se puede lograr la producción masiva de las seis bacterias que conforman el inoculante multi-especies, disminuyendo de seis medios selectivos a un solo medio de cultivo en medio líquido. Además, el número de corridas de fermentación se redujo de seis a dos, porque aunque se utiliza el mismo medio de producción, tres bacterias crecen a pH de 7 y tres lograron crecer juntas a pH de 5.5. Esta estrategia permitirá obtener grandes volúmenes de inoculante en tiempos más cortos de producción comparado con el método en medio sólido en cajas de Petri.

Se han mencionado en diversos artículos de la literatura la falta de normatividad y especificaciones que debe cumplir un inoculante para ser comercializado (Bashan 2014; Parnell *et al.* 2016); esta falta de regulación impide garantizar la efectividad de un producto agrobiológico incrementando la desconfianza por parte de los agricultores. En este trabajo también desarrollamos una metodología para identificar y cuantificar el número de bacterias viables presentes en el multi-inoculante, herramienta fundamental para asegurar la calidad en cada lote producido en biorreactor.

11. BIBLIOGRAFIA

- Armenta-Bojórquez, García-Gutiérrez, and Camacho-Báez. 2010. “Biofertilizantes En El Desarrollo Agrícola de México.” *Ra Ximhai* 6: 51–56.
- Arora, Naveen Kumar. 2015. “Effects of Soil Environment on Field Efficacy of Microbial Inoculants.” *Plant Microbes Symbiosis: Applied Facets*, no. November 2014: 1–381. doi:10.1007/978-81-322-2068-8.
- Baez-Rogelio, Antonino, Morales-García Yolanda Elizabeth, Quintero-Hernández, Verónica y Jesús Muñoz-Rojas. 2017. “Next Generation of Microbial Inoculants for Agriculture and Bioremediation.” *Microbial Biotechnology* 10 (1): 19–21. doi:10.1111/1751-7915.12448.
- Barrette, J., C. P. Champagne, D. Roy, and N. Rodrigue. 2000. “The Production of Mixed Cultures Containing Strains of *Lactococcus Lactis*, *Leuconostoc Cremoris* and *Lactobacillus Rhamnosus*, on Commercial Starter Media.” *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*. doi:10.1038/sj.jim.7000105.
- Bashan, Yoav. 1998. “Inoculants of Plant Growth-Promoting Bacteria for Use in Agriculture.” *Biotechnology Advances* 16 (4): 729–70.
- Bashan, Yoav. 2014. “Advances in Plant Growth-Promoting Bacterial Inoculant Technology : Formulations and Practical Perspectives.” *Plant and Soil* 1886 (378): 1–33. doi:10.1007/s11104-013-1956-x.
- Bashan, Yoav, and Gina Holguin. 1998. “Proposal for the Division of Plant Growth-Promoting Rhizobacteria into Two Classifications: Biocontrol-PGPB (Plant Growth-Promoting Bacteria) and PGPB.” *Soil Biology and Biochemistry*. doi:10.1016/S0038-0717(97)00187-9.
- Basu, Aditya, Debasish Das, Prashant Bapat, Pramod P. Wangikar, and Prashant S. Phale. 2009. “Sequential Utilization of Substrates by *Pseudomonas putida* CSV86: Signatures of Intermediate Metabolites and Online Measurements.” *Microbiological Research*. doi:10.1016/j.micres.2007.02.008.
- Belda, Eugeni, Ruben G.A. van Heck, Maria José Lopez-Sanchez, Stéphane Cruveiller, Valérie Barbe, Claire Fraser, Hans Peter Klenk, et al. 2016. “The Revisited Genome of *Pseudomonas putida* KT2440 Enlightens Its Value as a Robust Metabolic Chassis.” *Environmental Microbiology*. doi:10.1111/1462-2920.13230.
- Bertalan, Marcelo, Rodolpho Albano, Vânia de Pádua, Luc Rouws, Cristian Rojas, Adriana Hemerly, Kátia Teixeira, et al. 2009. “Complete Genome Sequence of the Sugarcane Nitrogen-Fixing Endophyte *Gluconacetobacter diazotrophicus* Pal5.” *BMC Genomics*. doi:10.1186/1471-2164-10-450.
- Bible, Amber N, Gurusahai K Khalsa-moyers, Tanmoy Mukherjee, Calvin S Green, Priyanka Mishra, Alicia Purcell, Anastasia Aksenova, Gregory B Hurst, and Gladys Alexandre. 2015. “Metabolic Adaptations of *Azospirillum brasilense* to Oxygen Stress by Cell-to-Cell Clumping and Flocculation.” *Applied and Environmental Microbiology* 81 (24): 8346–57. doi:10.1128/AEM.02782-15.Editor.
- Bible, Amber, Matthew H Russell, and Gladys Alexandre. 2012. “The *Azospirillum brasilense* Che1 Chemotaxis Pathway Controls Swimming Velocity , Which Affects Transient Cell-to-Cell Clumping.” *Journal of Bacteriology* 194 (13): 3343–55. doi:10.1128/JB.00310-12.

- Boniolo, Fabrizio Siqueira, Raphael Cardoso Rodrigues, Edson Oliveira Delatorre, Mauricio Moura, Da Silveira, Victor Martín Quintana Flores, and Marilia Amorim Berbert-Molina. 2009. "Glycine Betaine Enhances Growth of Nitrogen-Fixing Bacteria *Gluconacetobacter diazotrophicus* PAL5 under Saline Stress Conditions." *Current Microbiology*. doi:10.1007/s00284-009-9479-7.
- Brockwell, J., and P. J. Bottomley. 1995. "Recent Advances in Inoculant Technology and Prospects for the Future." *Soil Biology and Biochemistry* 27 (4–5): 683–97. doi:10.1016/0038-0717(95)98649-9.
- Caballero-Mellado, Jesus; Martinez-Aguilar, Lourdes; Paredes-Valdez, Guadalupe; y Estrada-de los Santos, Paulina, 2004. "*Burkholderia unamae* Sp. Nov., an N₂-Fixing Rhizospheric and Endophytic Species." *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. doi:10.1099/ijs.0.02951-0.
- Cassán, Fabricio. 2016. "Soil Biology & Biochemistry *Azospirillum* Sp . in Current Agriculture : From the laboratory to the field." *Soil Biology and Biochemistry* 103: 117–30. doi:10.1016/j.soilbio.2016.08.020.
- Chávez-Pacheco, J. L., M. Contreras-Zentella, J. Membrillo-Hernández, R. Arreguín-Espinoza, G. Mendoza-Hernández, S. Gómez-Manzo, and J. E. Escamilla. 2010. "The Quinohaemoprotein Alcohol Dehydrogenase from *Gluconacetobacter Xylinus*: Molecular and Catalytic Properties." *Archives of Microbiology*. doi:10.1007/s00203-010-0598-0.
- Damam, Malleswari, Kalpana Kaloori, Bagyanarayana Gaddam, and Rana Kausar. 2016. "Plant Growth Promoting Substances (Phytohormones) Produced by Rhizobacterial Strains Isolated from the Rhizosphere of Medicinal Plants." *International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research*.
- Depoorter, Eliza, Matt J. Bull, Charlotte Peeters, Tom Coenye, Peter Vandamme, and Eshwar Mahenthiralingam. 2016. "*Burkholderia*: An Update on Taxonomy and Biotechnological Potential as Antibiotic Producers." *Applied Microbiology and Biotechnology*. doi:10.1007/s00253-016-7520-x.
- Díaz-sáez, Yudy, Manuel Díaz-de Los Ríos, and Mario Alberto-casas. 2013. "Crecimiento de *Azospirillum brasilense* En Presencia de Disacáridos : Sacarosa Y Lactosa." *IDICA Sobre Los Derivados de Caña de Azucar* 47 (2): 23–30.
- Dodd, Ian C., and Juan Manuel Ruiz-Lozano. 2012. "Microbial Enhancement of Crop Resource Use Efficiency." *Current Opinion in Biotechnology*. doi:10.1016/j.copbio.2011.09.005.
- Estrada-de los Santos, Paulina, Fernando Uriel Rojas-Rojas, Erika Yanet Tapia-García, María Soledad Vásquez-Murrieta, and Ann M. Hirsch. 2016. "To Split or Not to Split: An Opinion on Dividing the Genus *Burkholderia*." *Annals of Microbiology*. doi:10.1007/s13213-015-1183-1.
- Fu, Nan, Paul Peiris, Julie Markham, and John Bavor. 2009. "A Novel Co-Culture Process with *Zymomonas Mobilis* and *Pichia Stipitis* for Efficient Ethanol Production on Glucose/xylose Mixtures." *Enzyme and Microbial Technology*. doi:10.1016/j.enzmictec.2009.04.006.
- Fukami, Josiane, Marco Antonio Nogueira, Ricardo Silva Araujo, Mariangela Hungria, L Triticum, and L Zea. 2016. "Assessing Inoculation Methods of Maize and Wheat with *Azospirillum brasilense*." *AMB Express*. Springer Berlin Heidelberg, 1–13. doi:10.1186/s13568-015-0171-y.
- Fukami, Josiane, Francisco Javier Ollero, Manuel Megías, and Mariangela Hungria. 2017. "Phytohormones and Induction of Plant-Stress Tolerance and Defense Genes by Seed and Foliar

- Inoculation with *Azospirillum brasilense* Cells and Metabolites Promote Maize Growth.” *AMB Express*. doi:10.1186/s13568-017-0453-7.
- García-Valdés, Elena, and Jorge Lalucat. 2016. “Pseudomonas: Molecular Phylogeny and Current Taxonomy.” In *Pseudomonas: Molecular and Applied Biology*. doi:10.1007/978-3-319-31198-2_1.
- Glaeser, Stefanie P., and Peter Kämpfer. 2014. “The Family *Sphingomonadaceae*.” In *The Prokaryotes: Alphaproteobacteria and Betaproteobacteria*. doi:10.1007/978-3-642-30197-1_302.
- Glick, Bernard R. 2015. *Beneficial Plant-Bacterial Interactions*. *Beneficial Plant-Bacterial Interactions*. doi:10.1007/978-3-319-13921-0.
- Glick, G Holguin C L Patten B R. 1999. “Genetics and Molecular Biology of *Azospirillum*.” *Bio Fertil Soils*, 10–23.
- Goebelt, Edwin M, and Noel R Krieg. 1984. “Fructose Catabolism in *Azospirillum brasilense* and *Azospirillum lipoferum*.” *Journal of Bacteriology* 159 (1): 86–92.
- Gordillo-Delgado, F., E. Marín, and A. Calderón. 2016. “Effect of *Azospirillum brasilense* and *Burkholderia unamae* Bacteria on Maize Photosynthetic Activity Evaluated Using the Photoacoustic Technique.” *International Journal of Thermophysics*. doi:10.1007/s10765-016-2101-x.
- Gutiérrez, Rodrigo a. 2012. “Systems Biology for Enhanced Plant Nitrogen Nutrition.” *Science*, 336 (6089): 1673–75. doi:10.1126/science.1217620.
- Jangra, Manoj, Prasanna D. Belur, Larisa B. Oriabinska, and Olexii M. Dugan. 2016. “Multistrain Probiotic Production by Co-Culture Fermentation in a Lab-Scale Bioreactor.” *Engineering in Life Sciences*. doi:10.1002/elsc.201500069.
- John, Rojan P, R D Tyagi, S K Brar, R Y Surampalli, and Danielle Prévost. 2011. “Bio-Encapsulation of Microbial Cells for Targeted Agricultural Delivery.” *Critical Reviews in Biotechnology*. doi:10.3109/07388551.2010.513327.
- Jones, J. Andrew, Victoria R. Vernacchio, Andrew L. Sinkoe, Shannon M. Collins, Mohammad H.A. Ibrahim, Daniel M. Lachance, Juergen Hahn, and Mattheos A.G. Koffas. 2016. “Experimental and Computational Optimization of an *Escherichia Coli* Co-Culture for the Efficient Production of Flavonoids.” *Metabolic Engineering*. doi:10.1016/j.ymben.2016.01.006.
- Ju, Xin, Hui-lei Yu Jiang, and Pan Jian-he Xu. 2012. “Improved Production of *Pseudomonas Sp* . ECU1011 Acetyl Esterase by Medium Design and Fed-Batch Fermentation.” *Bioprocess Biosyst Engioproces Biosyst Eng*, 323–31. doi:10.1007/s00449-011-0570-7.
- Kennedy, Ivan R., A. T M A Choudhury, and Mihály L. Kecskés. 2004. “Non-Symbiotic Bacterial Diazotrophs in Crop-Farming Systems: Can Their Potential for Plant Growth Promotion Be Better Exploited?” In *Soil Biology and Biochemistry*. doi:10.1016/j.soilbio.2004.04.006.
- Kim, Se Hyeuk, Jin Ho Kim, Bun Yeol Lee, and Pyung Cheon Lee. 2014. “The Astaxanthin Dideoxyglycoside Biosynthesis Pathway in *Sphingomonas Sp*. PB304.” *Applied Microbiology and Biotechnology*. doi:10.1007/s00253-014-6050-7.
- Lidén, G. 2002. “Understanding the Bioreactor.” *Bioprocess and Biosystems Engineering*. doi:10.1007/s004490100263.

- Liu, Xiangyang, and Yi Qiang Cheng. 2014. "Genome-Guided Discovery of Diverse Natural Products from *Burkholderia* Sp." *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*. doi:10.1007/s10295-013-1376-1.
- Lopes, Mateus Schreiner Garcez, José Gregório Cabrera Gomez, Marilda Keico Taciro, Thatiane Teixeira Mendonça, and Luiziana Ferreira Silva. 2014. "Polyhydroxyalkanoate Biosynthesis and Simultaneous Remotion of Organic Inhibitors from Sugarcane Bagasse Hydrolysate by *Burkholderia* Sp." *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*. doi:10.1007/s10295-014-1485-5.
- Luna, María F., Cecilia E. Bernardelli, María L. Galar, and José L. Boiardi. 2006. "Glucose Metabolism in Batch and Continuous Cultures of *Gluconacetobacter Diazotrophicus* PAL 3." *Current Microbiology*. doi:10.1007/s00284-005-4563-0.
- Luyben KChAM. Regime analysis for the scale-down of biotechnological processes. In: *Proceedings of the international symposium on bioreactor performance*. Mortensen U y Norman HJ (eds). Denmark, 1993. Pp. 159-169.
- Menéndez, Carmen; Luis E Trujillo; Ricardo Ramírez; Dianevys González-Peña; Davel Espinosa; Gil A Enriquez; Lázaro Hernández. 2014. "Production of a Liquid *Bradyrhizobium Japonicum* Inoculant with High Impact on the Mechanized Sowing of Soybean in Cuba." *Bioteconología Aplicada* 31: 116–20.
- Molina-Romero, Dalia (B), Antonino Baez, Verónica Quintero-Hernández, Miguel Castañeda-Lucio, Luis Ernesto Fuentes-Ramírez, María del Rocío Bustillos-Cristales, Osvaldo Rodríguez-Andrade, Yolanda Elizabeth Morales-García, Antonio Munive, and Jesús Muñoz-Rojas. 2017. "Compatible Bacterial Mixture, Tolerant to Desiccation, Improves Maize Plant Growth." *PLoS ONE*. doi:10.1371/journal.pone.0187913.
- Molina-Romero, Dalia, María del Rocío Bustillos-Cristales, Osvaldo Rodríguez-Andrade, Yolanda Elizabeth Morales-García, Yair Santiago-Saenz, Miguel Castañeda-Lucio, and Jesús Muñoz-Rojas. 2015. "Mecanismos de Fitoestimulación Por Rizobacterias , Aislamientos En América Y Potencial Biotecnológico." *Biológicas*.
- Molina-Romero, Dalia (A), Yolanda Elizabeth Morales-García, Ana-Laura Hernández-Tenorio, Miguel Castañeda-Lucio, Alma Rosa Netzahuatl-Muñoz, and Jesús Muñoz-Rojas. 2017. "*Pseudomonas putida* estimula el crecimiento de maíz en función de la temperatura." *Revista Iberoamericana de Ciencias* 4 (1): 80–88.
- Morales-García YE, Muñoz-Galindo L, Juárez-Hernández D, Hernández-Tenorio AL, Alatorre-Cruz JM, Molina-Romero D, Muñoz-García A, Muñoz-Rojas J et al. 2012. "Estimulación Del Crecimiento de Maíz Cultivado En Campo Mediante La Inoculación Con Un Inoculante Multiespecies." In *Memoria IX Encuentro, Participación de La Mujer En La Ciencia. León Guanajuato, México*.
- Morales-García, Y.E; Juárez-Hernández, D.; Fuentes-Ramirez, L.E.; Munive-Hernández, J.A.; Muñoz-Rojas, J. 2015. MX 2013007978A I: Formulacion de un inoculante multiespecies para potenciar el crecimiento de plantas, issued 2015.
- Morales-García, Y.E. Muñoz-Rojas, J. 2013. "Antagonismo Entre Bacterias de Interés Agrícola Y Evaluación de Inoculantes." *Bénemerita Universidad Autónoma de Puebla*.
- Muñoz-Rojas, J. 2005. "La Interacción *Gluconacetobacter diazotrophicus*-Caña de Azúcar Como Modelo Para El Estudio de La Transmisión de Bacterias Benéficas." *Elementos: Ciencia Y Cultura*.

- Mutturi, Sahai, Sharma, and Bisaria. 2016. "Strategies for High-Density Cultivation of Bio-Inoculants in Submerged Culture with Special Reference to Pseudomonads." In *Microbial Inoculants in Sustainable Agricultural Productivity*, 181–96. Springer. doi:10.1007/978-81-322-2647-5.
- Nelson, K. E., C. Weinel, I. T. Paulsen, R. J. Dodson, H. Hilbert, V. A P Martins dos Santos, D. E. Fouts, et al. 2002. "Complete Genome Sequence and Comparative Analysis of the Metabolically Versatile *Pseudomonas Putida* KT2440." *Environmental Microbiology*. doi:10.1046/j.1462-2920.2002.00366.x.
- Nielsen, Jens., and John. Villadsen. 2003. *Bioreaction Engineering Principles Second Edition. Reactions*. doi:10.1002/ep.670150306.
- Nikel, Pablo I., Max Chavarría, Tobias Fuhrer, Uwe Sauer, and Víctor De Lorenzo. 2015. "Pseudomonas Putida KT2440 Strain Metabolizes Glucose through a Cycle Formed by Enzymes of the Entner-Doudoroff, Embden-Meyerhof-Parnas, and Pentose Phosphate Pathways." *Journal of Biological Chemistry*. doi:10.1074/jbc.M115.687749.
- Oliveira, Marcos Vinicius V. De, Aline C. Intorne, Luciano de S. Vespoli, Hérica C. Madureira, Mariana R. Leandro, Telma N.S. Pereira, Fábio L. Olivares, Marília A. Berbert-Molina, and Gonçalo A. De Souza Filho. 2016. "Differential Effects of Salinity and Osmotic Stress on the Plant Growth-Promoting Bacterium *Gluconacetobacter Diazotrophicus* PAL5." *Archives of Microbiology*. doi:10.1007/s00203-015-1176-2.
- Oosterhuis, N., N. Kossen, A. Olivier, and E. Schenk. 1985. "Scale-down and Optimization Studies of the Gluconic Acid Fermentation by *Gluconobacter oxydans*." *Biotechnology and Bioengineering*. doi:10.1002/bit.260270521.
- Owen, D, A P Williams, G W Grif, and P J A Withers. 2014. "Use of Commercial Bio-Inoculants to Increase Agricultural Production through Improved Phosphorous Acquisition." *Applied Soil Ecology* 86: 41–54. doi:10.1016/j.apsoil.2014.09.012.
- Palomares LA, Ramírez OT 2000. Bioreactor scale-down en: *The Encyclopedia of Cell Technology; Spier, R. E. (ed)*, John Wiley and Sons, Inc., Pp. 174-183.
- Paredes-Mendoza, Marianela, and David Espinosa-Victoria. 2010. "Ácidos Orgánicos Producidos Por Rizobacterias Que Solubilizan Fosfato: Una Revisión Crítica." *Terra* 28 (1): 61–70. http://colposdigital.colpos.mx:8080/jspui/bitstream/10521/245/1/Paredes_Mendoza_M_DC_Edafologia_2010.pdf#page=23.
- Parnell, J. Jacob, Randy Berka, Hugh A. Young, Joseph M. Sturino, Yaowei Kang, D. M. Barnhart, and Matthew V. DiLeo. 2016. "From the Lab to the Farm: An Industrial Perspective of Plant Beneficial Microorganisms." *Frontiers in Plant Science*. doi:10.3389/fpls.2016.01110.
- Perin, L., L. Martinez-Aguilar, G. Paredes-Valdez, J. I. Baldani, P. Estrada-de los Santos, V. M. Reis, and Jesus Caballero-Mellado. 2006. "*Burkholderia silvatlantica* Sp. Nov., a Diazotrophic Bacterium Associated with Sugar Cane and Maize." *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. doi:10.1099/ijs.0.64362-0.
- Rebah, F. Ben, D. Prevost, A. Yezza, and R. D. Tyagi. 2007. "Agro-Industrial Waste Materials and Wastewater Sludge for Rhizobial Inoculant Production: A Review." *Bioresource Technology* 98 (18): 3535–46. doi:10.1016/j.biortech.2006.11.066.
- Reddy, C. A., Lalithakumari, J. 2014. Polymicrobial formulations for enhancing crop productivity. U. S., issued 2014. US 2014/0256547 A1. United States Patent Application Publication.

- Reddy, Chilekampalli A., and Ramu S. Saravanan. 2013. "Polymicrobial Multi-Functional Approach for Enhancement of Crop Productivity." *Advances in Applied Microbiology* 82: 53–113. doi:10.1016/B978-0-12-407679-2.00003-X.
- Reis Massena, Veronica, Vera Lucia, Divan Baldani, and José Ivo Baldani. 2015. "Isolation, Identification and Biochemical Characterization of *Azospirillum* Spp. and Other Nitrogen-Fixing Bacteria." In *Handbook for Azospirillum: Technical Issues and Protocols*. doi:10.1007/978-3-319-06542-7.
- Sará-Páez, Martin, Martha Contreras-Zentella, Saúl Gómez-Manzo, Alejandra Abigail González-Valdez, Rolando Gasca-Licea, Guillermo Mendoza-Hernández, José Edgardo Escamilla, and Horacio Reyes-Vivas. 2015. "Purification and Characterization of the Membrane-Bound Quinoprotein Glucose Dehydrogenase of *Gluconacetobacter Diazotrophicus* PAL 5." *Protein Journal*. doi:10.1007/s10930-014-9596-4.
- Sarkar, Dayanidhi, Masahiro Yabusaki, Yuta Hasebe, Pei Yee Ho, Shuji Kohmoto, Takayuki Kaga, and Kazuyuki Shimizu. 2010. "Fermentation and Metabolic Characteristics of *Gluconacetobacter obediens* for Different Carbon Sources." *Applied Microbiology and Biotechnology*. doi:10.1007/s00253-010-2474-x.
- Sawana, Aman, Mobolaji Adeolu, and Radhey S. Gupta. 2014. "Molecular Signatures and Phylogenomic Analysis of the Genus *Burkholderia*: Proposal for Division of This Genus into the Emended Genus *Burkholderia* Containing Pathogenic Organisms and a New Genus *Paraburkholderia* Gen. Nov. Harboring Environmental Species." *Frontiers in Genetics*. doi:10.3389/fgene.2014.00429.
- Schroeder, Julian I, Emmanuel Delhaize, Wolf B Frommer, Mary Lou Guerinot, Maria J Harrison, Luis Herrera-estrella, Tomoaki Horie, et al. 2013. "Using Membrane Transporters to Improve Crops for Sustainable Food Production." *Nature* 497 (7447). Nature Publishing Group: 60–66. doi:10.1038/nature11909.
- Serrat, R. et al. 2004. *Symbiotic Nitrogen Fixation: Prospects for Enhanced Application in Tropical Agriculture. Biotechnology-Based Contributions to Enhancing Legume 47 Productivity in Resource-Poor Areas*. Oxford & IBH Publishing Co. Pvt. Ltd., New Delhi
- Someya, Nobutaka, Seishi Ikeda, and Kenichi Tsuchiya. 2013. "*Pseudomonas* Inoculants as Agents for Plant Disease Management." In *Bacteria in Agrobiolgy: Disease Management*. doi:10.1007/978-3-642-33639-3_8.
- Song, Ok Ryul, Seung Jin Lee, Yong Seok Lee, Sang Cheol Lee, Keun Ki Kim, and Yong Lark Choi. 2008. "Solubilization of Insoluble Inorganic Phosphate by *Burkholderia cepacia* DA23 Isolated from Cultivated Soil." *Brazilian Journal of Microbiology*. doi:10.1590/S1517-83822008000100030.
- Sun, Baojiang, Peipei Han, Ruyu Tao, Qixiu Pang, and Shiru Jia. 2015. "Optimization of Cultural Conditions for Extracellular Polymeric Substances (EPS) Production by *Burkholderia* Using Response Surface Methodology." In *Advances in Applied Biotechnology*, 295–303. Springer. doi:10.1007/978-3-662-46318-5.
- Tamay de Dios L, Ibarra C Velasquillo C. 2013. "Fundamentos de La Reaccion En Cadena de La Polimerasa (PCR) Y La PCR En Tiempo Real." *Mediagraphic*.
- Trivedi, Pankaj, Anita Pandey, and Lok Man S. Palni. 2012. "Bacterial Inoculants for Field Applications under Mountain Ecosystem: Present Initiatives and Future Prospects." In *Bacteria in Agrobiolgy: Plant Probiotics*. doi:10.1007/978-3-642-27515-9_2.

- Valverde, A, S Castro-Sowinski, A Lerner, S Fibach, O Matan, S Burdman, and Y Okon. 2008. "Exopolysaccharide Production and Cell Aggregation in *Azospirillum Brasilense*." In *Biological Nitrogen Fixation: Towards Poverty Alleviation through Sustainable Agriculture. Proceedings of the 15th International Nitrogen Fixation Congress and the 12th International Conference of the African Association for Biological Nitrogen Fixation* .
- Vanegas, Javier, and Daniel Uribe-vélez. 2014. "Selection of Mixed Inoculants Exhibiting Growth-Promoting Activity in Rice Plants from Undefined Consortia Obtained by Continuous Enrichment." *Plant Soil*, 215–27. doi:10.1007/s11104-013-1960-1.
- Vassilev, N, M Vassileva, A Lopez, V Martos, and A Reyes. 2015. "Unexploited Potential of Some Biotechnological Techniques for Biofertilizer Production and Formulation." doi:10.1007/s00253-015-6656-4.
- Vicario, Julio C, Emiliano D Primo, Marta S Dardanelli, and Walter Giordano. 2015. "Promotion of Peanut Growth by Co-Inoculation with Selected Strains of *Bradyrhizobium* and *Azospirillum*." *Journal of Plant Growth Regulation*. Springer US. doi:10.1007/s00344-015-9547-0.
- Vivanco-Calixto, R; Molina-Romero, D; Morales-García, Y.E.; Quintero-Hernández, V; Munive-Hernández, A; Baez-Rogelio, A; y Muñoz-Rojas, J. 2016. "Reto Agrobiotecnológico: Inoculantes Bacterianos de Segunda Generación." *Alianzas Y Tendencias* 1 (1): 9–19.
- Wang, Ya Yun, Po Kai Hsu, and Yi Fang Tsay. 2012. "Uptake, Allocation and Signaling of Nitrate." *Trends in Plant Science*. doi:10.1016/j.tplants.2012.04.006.
- Xu, Xiao Ying, Shu Hao Dong, Sha Li, Xiao Ye Chen, Ding Wu, and Hong Xu. 2015. "Statistical Experimental Design Optimization of Rhamsan Gum Production by *Sphingomonas* Sp. CGMCC 6833." *Journal of Microbiology* 53 (4): 272–78. doi:10.1007/s12275-015-3662-2.
- Yabuuchi, Eiko, Ikuya Yano, Hiroshi Oyaizu, Yasuhiro Hashimoto, Takayuki Ezaki, and Hiroyuki Yamamoto. 1990. "Proposals of *Sphingomonas paucimobilis* Gen. Nov. and Comb. Nov., *Sphingomonas parapaucimobilis* Sp. Nov., *Sphingomonas Yanoikuyae* Sp. Nov., *Sphingomonas adhaesiva* Sp. Nov., *Sphingomonas capsulata* Comb. Nov., and Two Genospecies of the Genus *Sphingomonas*." *Microbiology and Immunology*. doi:10.1111/j.1348-0421.1990.tb00996.x.
- York, H-P. Cheng, B. Pellock, L. Lecour, G. Campbell and G. Walker. 1997. "Role of Exopolysaccharides in Nodule Invasion by *Rhizobium Meliloti*." In *Biological Nitrogen Fixation for the 21st Century*, 193–98.

12. ANEXOS

12.1 Caracterización del crecimiento individual en cultivos sumergidos en matraces

12.1.1 *Gluconacetobacter diazotrophicus* PA15^T

En la figura 19 se muestra el crecimiento no detectado de *Gluconacetobacter diazotrophicus* PA15^T en el medio LB Modificado inferido por la turbidez. Se realizaron mediciones de densidad óptica a las 24 y 48 horas.

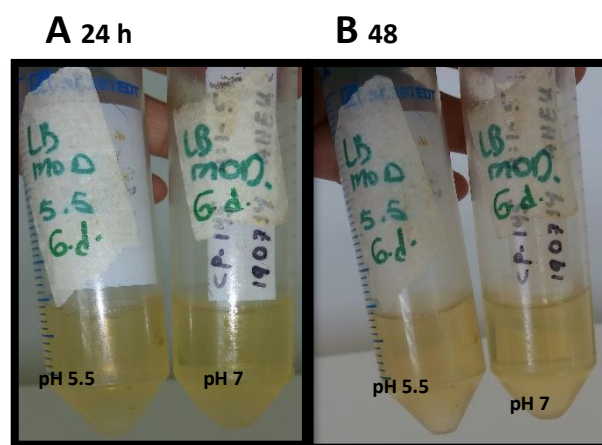


Figura 19. *Gluconacetobacter diazotrophicus* PA15^T en medio LB Modificado a las 24 y 48 horas sin cambio de turbidez.

En la figura 20 se muestra el crecimiento de *Gluconacetobacter* en su medio selectivo LGI^{CAZ}, el cual se utiliza para el conteo de ufc/mL. En el cuadro C están las bacterias provenientes del medio LGI líquido y D contiene las bacterias provenientes del Medio de producción. Ambas poseen la misma morfología característica de esta bacteria.

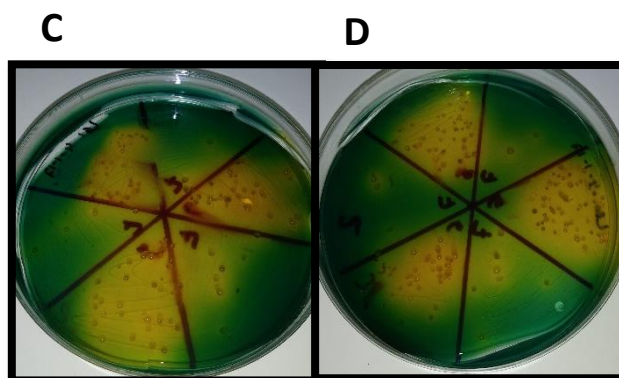


Figura 20. Crecimiento de *Gluconacetobacter diazotrophicus* PA15^T en 48 h, E: LGI y F: Medio de Producción.

12.1.2 *Burkholderia unamae* MTI641^T

La figura 21 presenta el comportamiento de *Burkholderia unamae* en LB Modificado a pH 5.5 y 7.

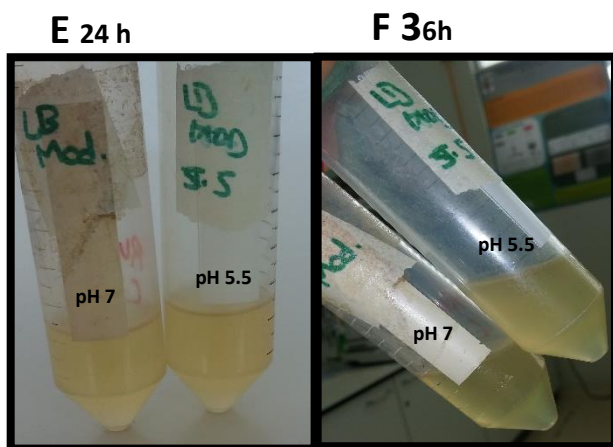


Figura 21. Crecimiento de *Burkholderia unamae* MTI 641^T en medio LB Modificado a las 24 y 36 horas a pH 5.5 y 7 inferido por los cambios en absorbancia.

12.2 Caracterización de *Pseudomonas putida* KT2440 en biorreactor

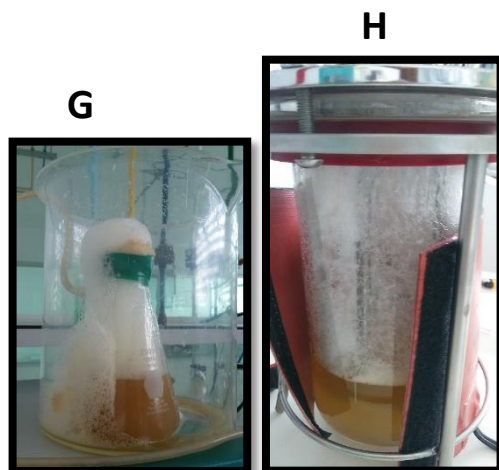


Figura 22: Formación de espuma en la hora 5-6 de *Pseudomonas putida* crecida en biorreactor. La imagen del lado izquierdo (**G**) corresponde al matraz quitazato conectado al venteo de la jarra del equipo, y en la imagen del lado derecho (**H**) es la jarra del equipo.

12.3 Oligonucleótidos específicos de las bacterias del EMMIM-1

La secuencia de los oligonucleótidos amplificados se enlista a continuación:

Azospirillum brasilense sp7: laf1

F: TGA TCC AGA ACG ACA TCG AC
R: GCG GAA CAG CGA GAG AGA ATG

Azospirillum brasilense lateral flagellin (laf1) gene, complete cds
Sequence ID: [U26679.1](#) Length: 1573 Number of Matches: 2

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
40.1 bits(20)	1e-04	20/20(100%)	0/20(0%)	Plus/Plus
Query 1	TGATCCAGAACGACATCGAC	20		
Sbjct 533	TGATCCAGAACGACATCGAC	552		

Pseudomonas putida KT2440: FliM

F: ATG AAA TCG ATG CCC TGT TGC
R: GGC TCA ATC ATC GAG TAC GG

Pseudomonas putida FliK (fliK), FliL, FliM (fliM), FliN (fliN), FliO (fliO), FliP (fliP), FliQ (fliQ), FliR (fliR), and FliB (fliB) genes, complete cds; and unknown gene

Sequence ID: [AF031418.3](#) Length: 10493 Number of Matches: 2

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
42.1 bits(21)	2e-04	21/21(100%)	0/21(0%)	Plus/Plus
Query 1	ATGAAATCGATGCCCTGTTGC	21		
Sbjct 4464	ATGAAATCGATGCCCTGTTGC	4484		

Related Information

Burkholderia unamae MTI641^T: Fenol hidroxilasa

F: ATC TGT TGT TCG TGC CCT TC
R: CCA GAA CCA CTT GTC GAT CC

Burkholderia unamae strain MTI-641 phenol hydroxylase alpha subunit gene, partial cds
Sequence ID: [EF151010.1](#) Length: 203 Number of Matches: 2

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
40.1 bits(20)	4e-08	20/20(100%)	0/20(0%)	Plus/Plus
Query 1	ATCTGTTGTTCTGTCGCCCTTC	20		
Sbjct 11	ATCTGTTGTTCTGTCGCCCTTC	30		

Gluconacetobacter diazotrophicus PA1^{5T}: QuiGlu

F: GGT CTA CGA CAA CCA GAC C
R: GTC GTT CCT CGA CAC GGT AG

Gluconacetobacter diazotrophicus PAI 5, complete genome
Sequence ID: [CP001189.1](#) Length: 3887492 Number of Matches: 931

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
38.2 bits(19)	2e-04	19/19(100%)	0/19(0%)	Plus/Plus
Query 1	GGTCTACGACAACCAAGACC	19		
Sbjct 2639583	GGTCTACGACAACCAAGACC	2639601		

Sphingomonas sp OF178: 16s

F: AAG CCT GAT CCA GCC ATA CC
R: CAG TGT TGG TCC AGG TAG CT

Uncultured Sphingomonas sp. isolate DGGE gel band CPM15 16S ribosomal RNA gene, partial sequence
Sequence ID: [KJ009231.1](#) Length: 194 Number of Matches: 1

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
40.1 bits(20)	0.001	20/20(100%)	0/20(0%)	Plus/Plus
Query 1	AAGCCTGATCCAGCCATACC	20		
Sbjct 42	AAGCCTGATCCAGCCATACC	61		

12.4 Evaluación de *Azospirillum* y *Bradyrhizobium* con sacarosa y ácido succínico en matraces con diferentes condiciones de cultivo.

A Sp7 & HR 6 MS22 (Sacarosa)				
T (H)	OD600		ufc/mL	
	MATRAZ 1	pH Matraz 1	Sp7	MS22
0	0.21	6.81	5.00E+03	
3	0.37	7.12		
6	1.19	7.15	1.50E+04	
6	1.36	7.02	5.00E+03	3.50E+06
8	1.99	6.65		
12	2.68	5.99	5.00E+04	1.15E+07
16	3.23	6.14	3.00E+06	8.50E+06
24	4.03	6.13	9.00E+06	4.00E+06
30	4.94	6.21		
36	4.95	6.3	9.40E+05	7.00E+07
48	7.79	6.69	4.05E+06	2.00E+08

B	
Y.E.	10 g/L
Sacarosa	20 g/L
MgSO4	0.4 g/L
KH2PO4	0.53 g/L
K2HPO4	0.43 g/L

C Sp7 + MS22 (Sacarosa y A. succínico)				
T (H)	OD600		ufc/mL	
	MATRAZ 2	pH Matraz 2	Sp7	MS22
0	0.54	6.88	1.00E+03	5.90E+06
3	0.67	6.99		
6	1.15	7.05	2.00E+04	1.45E+07
8	2.35	6.94		
12	3.73	6.56	5.00E+04	5.50E+07
16	4.85	6.50	1.50E+05	8.00E+07
24	7.3	6.61	7.50E+06	1.35E+08
30	8.11	6.75		
36	8.14	6.68	5.05E+05	1.4E+08
48	9.61	6.05	6.00E+05	2.5E+08

D	
Y.E.	10 g/L
Sacarosa	20 g/L
Acido succi	5 g/L
MgSO4	0.4 g/L
KH2PO4	0.53 g/L
K2HPO4	0.43 g/L

Tabla 6 Caracterización del crecimiento de co-inoculaciones en matraz. **A:** Densidades ópticas, pH y ufc/mL del crecimiento de *Azospirillum* y *Bradyrhizobium* con ácido succínico como fuente de carbono a pH de 7 desde inicio. **B:** Composición del medio. **C:** Densidades ópticas, pH y UFC/mL del crecimiento de *Azospirillum* y *Bradyrhizobium* con sacarosa y ácido succínico como fuente de carbono a pH de 7 desde inicio. **D:** Composición del medio.

12.5 Evaluación de *Sphingomonas* y *Pseudomonas* en sacarosa y ácido succínico en matraces con diferentes condiciones de cultivo.

E OF178 con Acido Succínico			
OD600			
T (H)	MATRAZ 1	pH Matraz 1	ufc/mL
0	0.12	6.86	2.40E+08
4	0.64	7.53	
6	1.09	7.32	1.15E+09
8	1.47	7.43	
12	2.1	7.76	5.00E+09
16	2.49	7.88	8.50E+09
24	3.53	8.25	1.4E+10

F

Y.E.	10 g/L
A. succínico	5 g/L
MgSO4	0.4 g/L
KH2PO4	0.53 g/L
K2HPO4	0.43 g/L

G OF & KT con Sacarosa + Acido succínico				
OD600				
T (H)	MATRAZ 3	pH matraz 3	ufc/mL KT 2440	ufc/mL OF178
0	0.47	6.87	4.25E+07	2.4E+08
4	0.99	7.38		
6	1.48	7.49	5E+08	1.15E+09
8	1.96	7.6		
12	2.45	7.94	5.5E+08	4.25E+09
16	3.05	8.01	9.5E+08	5.3E+09
24	4.93	7.55	1E+09	4E+09

H

Y.E.	10 g/L
Sacarosa	20 g/L
Acido succi	5 g/L
MgSO4	0.4 g/L
KH2PO4	0.53 g/L
K2HPO4	0.43 g/L

I OF con Sacarosa, a la hr 6 agregar acido succínico			
OD600			
T (H)	MATRAZ 2	PH Matraz 5	ufc/mL OF178
0	0.2	6.96	2.80E+08
4	0.68	7.23	
6	1.2	7.38	1.90E+09
6	1.23	4.77	2.40E+08
8	1.3	4.76	
12	1.32	4.81	ND
16	1.33	4.82	ND
24	1.53	4.83	ND
30	1.63	4.78	ND

J

Y.E.	10 g/L
Sacarosa	20 g/L
Acido succi	5 g/L
MgSO4	0.4 g/L
KH2PO4	0.53 g/L
K2HPO4	0.43 g/L

Tabla 7. E: Densidades ópticas, pH y ufc/mL del crecimiento de *Sphingomonas* con ácido succínico como fuente de carbono a pH de 7 desde inicio. F: Composición del medio. G: Densidades ópticas, pH y UFC/mL del crecimiento de *Sphingomonas* y *Pseudomonas* con sacarosa y ácido succínico como fuente de carbono a pH de 7 desde inicio. H: Composición del medio. I: Densidades ópticas, pH y UFC/mL del crecimiento de *Sphingomonas* con sacarosa y ácido succínico (hora 6) como fuente de carbono a pH de 7 desde inicio. J: Composición del medio.

12.6 Evaluación de *Sphingomonas-Pseudomonas* y *Azospirillum-Bradyrhizobium* en sacarosa como fuente de carbono en matraces.

K Sp7 + MS22 (Sacarosa)				
T (H)	OD600 MATRAZ 3	pH Matraz 3	ufc/mL Sp7	ufc/mL MS22
0	0.63	6.84	1.50E+03	5.75E+06
3	0.78	7.28		
6	1.74	7	1.00E+04	1.40E+07
8	2.51	6.66		
12	3.61	6.21	5.00E+04	4.50E+07
16	4.35	6.13	9.00E+04	1.00E+08
24	5.7	6.15	1.00E+06	6.50E+07
30	7.08	6.37		
36	7.39	6.37	2.80E+05	1.10E+08
48	9.05	6.83	4.40E+06	1.50E+08

M	
Y.E.	10 g/L
Sacarosa	20 g/L
MgSO4	0.4 g/L
KH2PO4	0.53 g/L
K2HPO4	0.43 g/L

L OF & KT con Sacarosa				
T (H)	OD600 MATRAZ 2	pH Matraz 2	ufc/mL KT 2440	ufc/mL OF178
0	0.33	6.99	3.40E+07	2.55E+08
4	0.89	7.46		
6	1.61	7.56	7.00E+08	1.10E+09
8	1.9	7.76		
12	2.83	7.95	6.50E+08	4.40E+09
16	3.23	7.97	1.25E+09	4.20E+09
24	4.44	8.22	1.00E+09	6.50E+09

Tabla 8. K y L. Crecimiento de *Azospirillum* con *Bradyrhizobium*, *Sphingomonas* y *Pseudomonas* en sacarosa como fuente de carbono inoculadas al mismo tiempo. M: Medio de producción.

12.7 Curvas patrón de la cuantificación de sacarosa (DNS)

Se realizó una curva patrón por cada cada cinética individual y en co-inoculación de tres bacterias. Solo para las co-inoculaciones de dos bacterias se utilizó la misma gráfica debido a que el experimento se realizó el mismo día. Las curvas patrón y las ecuaciones se muestran a continuación:

Tabla 9: Curvas patrón de sacarosa en g/L de cultivos individuales y co-cultivos de dos y tres bacterias.

KT2440		MS222		PAL5		OF178		SP7		MTI	
[SAC] g/L	OD _{540NM}	[SAC]g/L	OD _{540NM}	[SAC] g/L	OD _{540NM}	[SAC]g/L	OD _{540NM}	[SAC]g/L	OD _{540NM}	[SAC]	OD _{540NM}
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
0.4	0.069	0.4	0.049	0.4	0.006	0.4	0.054	0.4	0.049	0.4	0.019
0.8	0.146	0.8	0.099	0.8	0.063	0.8	0.083	0.8	0.099	0.8	0.064
1.2	0.221	1.2	0.124	1.2	0.084	1.2	0.143	1.2	0.124	1.2	0.079
1.6	0.239	1.6	0.178	1.6	0.144	1.6	0.212	1.6	0.178	1.6	0.131
2	0.27	2	0.271	2	0.225	2	0.237	2	0.241	2	0.201
3	0.481	3	0.281	3	0.319	3	0.374	3	0.281	3	0.3
4	0.541	4	0.474	4	0.435	4	0.474	4	0.474	4	0.404
5	0.678	5	0.657	5	0.633	5	0.642	5	0.657	5	0.572
6	0.845	6	0.702	6	0.737	6	0.736	6	0.702	6	0.639

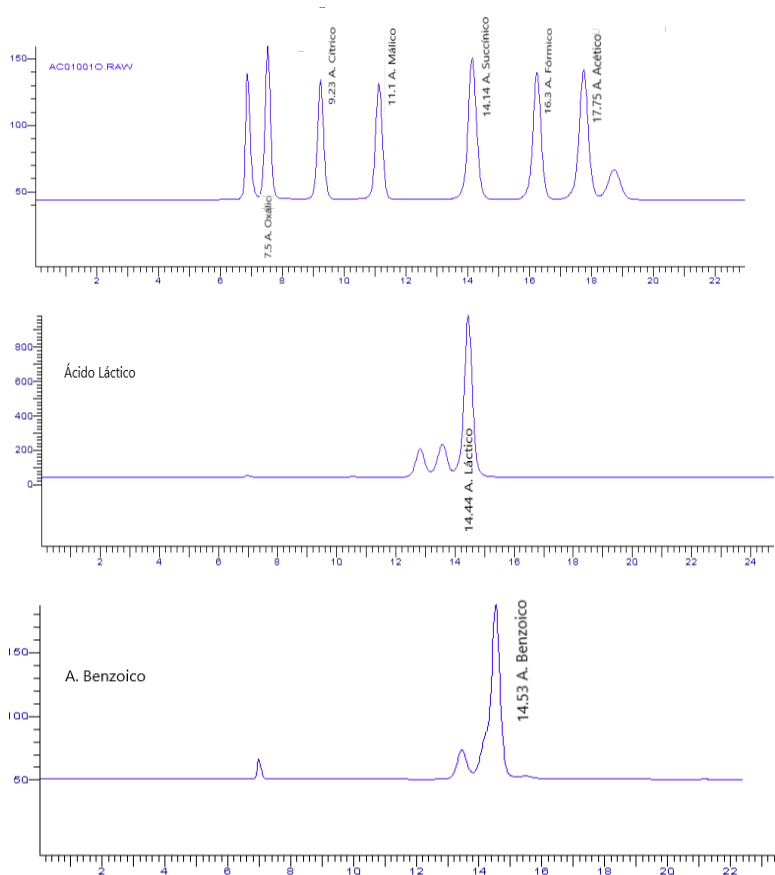
SP7+OF+KT		PA15+MTI+MS		OF178+KT2440; MS+SP7; PA15 +MTI	
[SAC]g/L	OD _{540NM}	[SAC]g/L	OD _{540NM}	[SAC]g/L	OD _{540NM}
0	0	0	0	0	0
0.4	0.027	0.4	0.026	0.4	0.019
0.8	0.101	0.8	0.088	0.8	0.064
1.2	0.145	1.2	0.132	1.2	0.079
1.6	0.199	1.6	0.186	1.6	0.131
2	0.241	2	0.225	2	0.201
3	0.281	3	0.334	3	0.3
4	0.47	4	0.448	4	0.404
5	0.66	5	0.56	5	0.572
6	0.73	6	0.7	6	0.639

CEPA	Ecuación	R ²
MS22	$y = 0.1211x - 0.007$	0.98
PA15	$y = 0.1282x - 0.043$	0.9901
OF178	$y = 0.1243x - 0.0029$	0.9972
sp7	$y = 0.1215x - 0.011$	0.9824
KT2440	$y = 0.135x + 0.0245$	0.9906
MTI	$y = 0.1127x - 0.0297$	0.9918
sp7+OF+KT	$y = 0.1242x - 0.0126$	0.9831
PA15+MS+MTI	$y = 0.1157x - 0.0077$	0.9986
PA15+MTI		
OF178+KT2440	$y = 0.1127x - 0.0297$	0.9918
SP7+MS22		

Ecuación de la recta: $y = mx + b$ y R^2 obtenidas de las curvas patrón.

12.8 Análisis de metabolitos en HPLC de las caracterizaciones del crecimiento individual y en co-cultivos de tres bacterias.

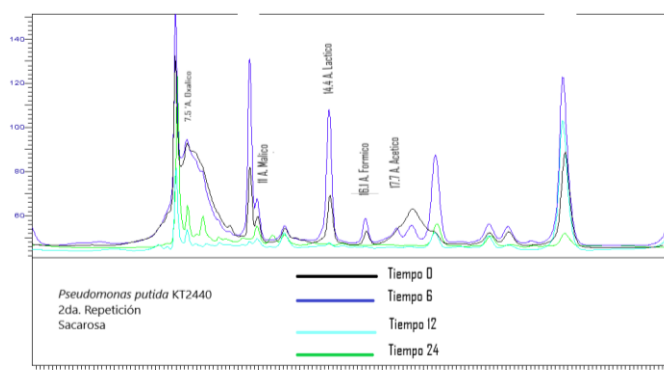
11.8.1 Estándar Bio-Rad, lactosa y ácido benzoico



Ácido oxálico	0.8mM	Ácido cítrico	4mM
Tiempo	Area	Tiempo	Area
7.53	1511725	9.23	1276334
0.07202		0.768498	
Ácido málico	8mM	Ácido succínico	20mM
Tiempo	Area	Tiempo	Area
11.12	1381249	14.14	2124414
1.072699		2.3618	
Estándar A. Láctico	0.8mM	Benzoato de sodio	1mM
Tiempo	Area	Tiempo	Area
14.44	19363068	14.53	2839919
0.072064		0.11411	
Ácido fórmico	20mM	Ácido acético	40mM
Tiempo	Area	Tiempo	Area
16.3	1810002	17.75	2094393
0.840508		2.402	

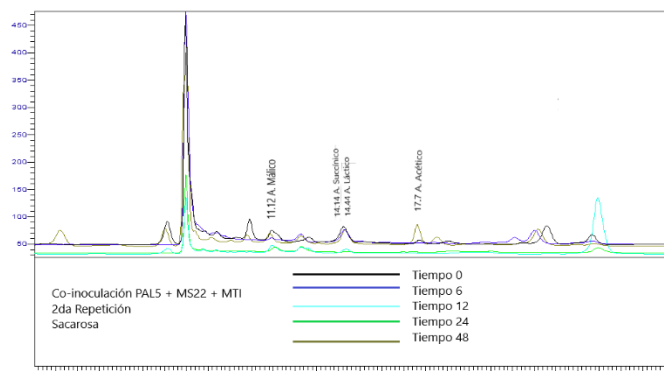
12.8.2 Análisis de metabolitos cultivos individuales

En los siguientes cromatogramas se presentan los ácidos orgánicos producidos durante la caracterización individual de cada bacteria en biorreactor. Cada cromatograma contiene la información de la cinética a la que corresponden dichos análisis.



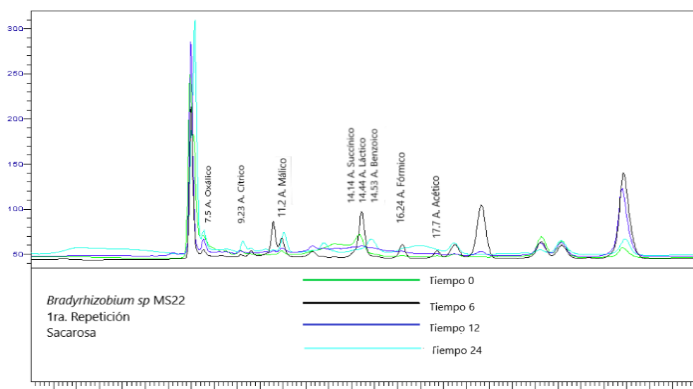
KT2440: Concentración ácidos orgánicos en g/L

t	Oxálico	Cítrico	Málico	Láctico	Fórmico	Acético
0	0.183	ND	0.148	0.002	0.06	ND
6	0.104	ND	0.227	0.004	0.101	0.3
12	0.006	0.048	0.09	0.0003	ND	ND
24	0.013	ND	0.174	ND	ND	ND



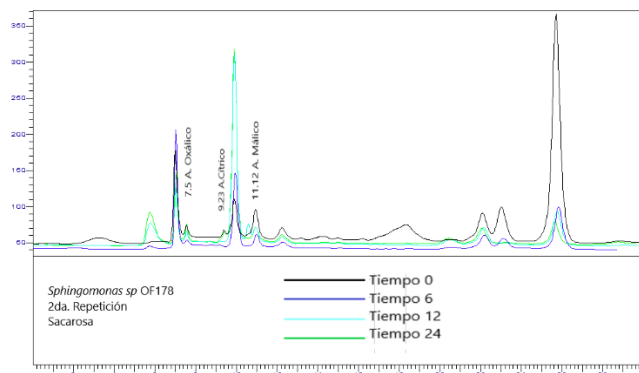
PA15: Concentración de ácidos orgánicos en g/L

t	Oxálico	Málico	Succínico	Benzoico	Acético
0	0.03	0.15	0.89	ND	ND
6	0.02	0.23	0.82	ND	ND
12	0.04	ND	0.84	ND	ND
24	0.03	0.55	6.66	0.03	0.79
48	0.03	0.76	0.27	0.08	1.53



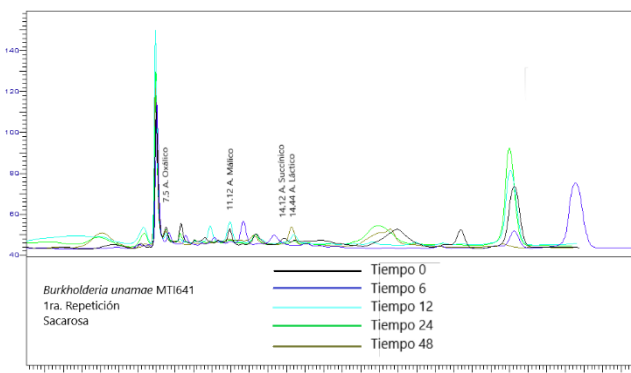
MS22: Concentración de ácidos orgánicos en g/L

t	Oxálico	Cítrico	Málico	Succínico	Láctico	Benzoico	Fórmico	Acético
0	ND	0.02	0.06	0.40	ND	ND	ND	ND
6	0.002	0.02	0.23	ND	0.004	ND	0.14	0.22
12	0.01	0.02	0.07	ND	0.001	ND	ND	ND
24	ND	0.10	0.29	ND	ND	0.02	0.34	ND



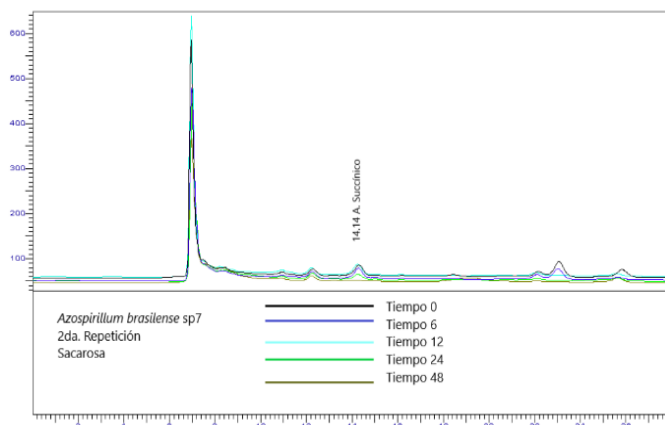
OF178: Concentración de ácidos orgánicos en g/L

t	Oxálico	Cítrico	Mállico	Succínico
0	0.01	0.00003	0.58	0.23
6	0.002	ND	0.29	ND
12	0.01	ND	0.21	ND
24	0.01	ND	0.25	ND



MTI: Concentración de ácidos orgánicos en g/L

t	Oxálico	Mállico	Succínico	Láctico	Fórmico
0	0.01	0.11	0.12	0.0002	ND
6	ND	0.12	ND	ND	ND
12	0.003	0.17	ND	0.0005	ND
24	0.004	0.03	ND	0.0002	ND
36	0.003	0.02	ND	0.0008	0.01

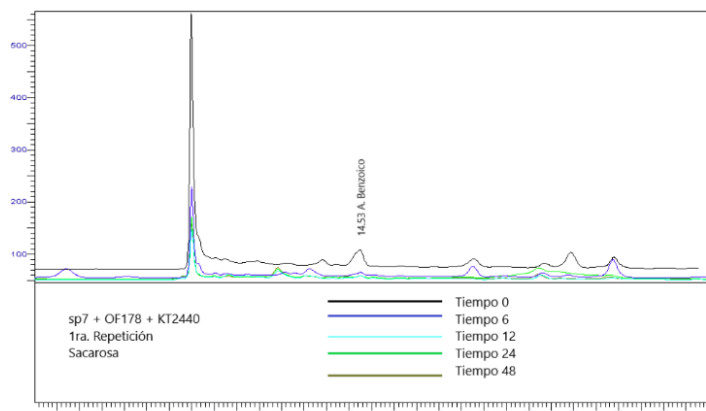


Sp7: Concentración de ácidos orgánicos en g/L

t	Oxálico	Mállico	Succínico
0	0.03	0.11	0.76
6	ND	0.08	0.72
12	ND	0.17	0.75
24	ND	0.04	0.38
48	0.02	ND	ND

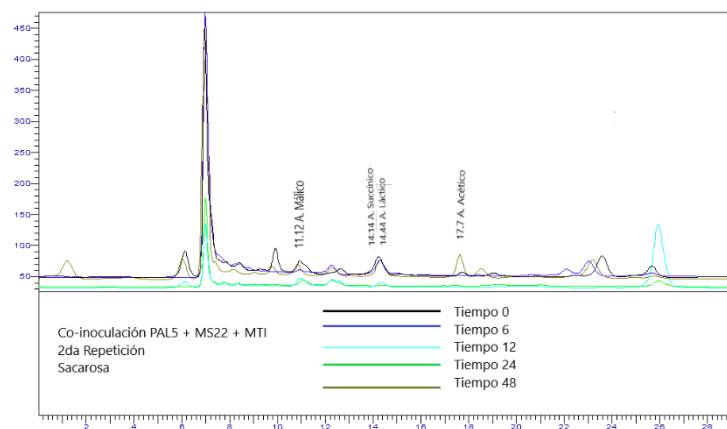
12.8.3 Análisis de metabolitos co-cultivos de tres bacterias

En los siguientes cromatogramas se presentan los ácidos orgánicos producidos por las bacterias cuando crecen en co-inoculación de tres bacterias.



Co-inoculación sp7+OF+KT
Concentración de ácidos orgánicos en g/L

t	Láctico	Benzoico	Málico	Succínico
0	0.002	ND	ND	ND
6	ND	0.01	ND	ND
12	ND	0.003	0.26	ND
24	ND	0.004	0.31	ND
48	ND	0.004	0.37	0.08



Co-inoculación PA15 + MTI + MS22
Concentración ácidos orgánicos en g/L

t	Oxálico	Málico	Succínico	Láctico	Acético
0	ND	0.39	0.94	ND	0.19
6	0.02	0.32	2.06	ND	ND
12	0.002	0.24	0.16	ND	ND
24	0.0005	0.17	ND	0.0001	ND
48	ND	0.63	1.04	ND	0.76