



PRODUCCIÓN DE *Chlorella sorokiniana* UTILIZANDO EFLUENTE DE BACTERIAS FIJADORAS DE NITRÓGENO.

JUAN CARLOS MARTINEZ MUÑOZ

Universidad del Valle
Facultad de Ingeniería
Escuela de Ingeniería Química
Programa Académico de Ingeniería Química
Santiago de Cali, 2025

PRODUCCIÓN DE *Chlorella sorokiniana* UTILIZANDO EFLUENTE DE BACTERIAS
FIJADORAS DE NITRÓGENO.

JUAN CARLOS MARTINEZ MUÑOZ

Trabajo de grado

Directora:
Janneth Sanabria

Codirectora
Erika Yuliana Ortiz Montoya

Universidad del Valle
Facultad de Ingeniería
Escuela de Ingeniería Química
Programa Académico de Ingeniería Química
Santiago de Cali, 2025

TABLA DE CONTENIDO.

1. INTRODUCCIÓN.....	5
2. PLANTEAMIENTO Y JUSTIFICACIÓN DEL PROBLEMA.....	6
3. OBJETIVOS.....	8
3.1. Objetivo general.....	8
3.2. Objetivos específicos.....	8
4. ANTECEDENTES.....	8
4.1 Cultivo de microalgas.....	8
4.2 Consorcios para producir inoculantes.....	9
4.3 Cocultivo de microalgas con fijadores.....	11
5. MARCO TEÓRICO Y CONTEXTUAL.....	12
5.1 Importancia de las microalgas en la Economía.....	12
5.2 Nutrición y Costos de Producción de microalgas.....	12
5.3 Fijación biológica de Nitrógeno.....	13
6. MATERIALES Y MÉTODOS.....	15
6.1. Origen de los Inóculos.....	15
a. Consorcios microbianos fijadores de nitrógeno (CFN).....	15
b. Azotobacter Vinelandii (Z).....	15
c. Chlorella sorokiniana.....	15
6.2. Montaje y operación de Bioreactores.....	16
6.2.1. Unidad Experimental para el crecimiento de fijadores Nitrógeno.....	16
6.2.2. Unidad Experimental para el crecimiento de C. sorokiniana.....	16
• Unidad Experimental 1: Viales de Vidrio.....	17
• Unidad Experimental 2: Biorreactores de Vidrio.....	17
6.2.3. Diseño de los experimentos y parámetros de operación de los bioreactores..	17
6.2.3.1. Estrategia Operativa de los Biorreactores en el Cultivo de Fijadores de Nitrógeno.....	17
6.2.3.2. Diseño Experimental para el Cultivo de C. sorokiniana.....	18
6.2.4. Medios de Cultivo.....	20
6.2.5. Variables fisicoquímicas.....	22
6.3. Análisis estadístico.....	23
6.4. Expresiones matemáticas.....	23
6.4.1. Tasa de crecimiento.....	23
6.4.2. Rendimiento de producción.....	23
6.5. Comparación de costos de los medios utilizados para Chlorella sorokiniana.....	24
7. RESULTADOS Y ANÁLISIS.....	24
7.1. Evaluación del crecimiento de consorcios bacterianos fijadores de nitrógeno.....	24
7.2. Evaluación del crecimiento de C. sorokiniana en diferentes medios.....	28
7.3. Análisis de costos.....	34
8. CONCLUSIONES.....	35
9. PERSPECTIVAS.....	37
10. REFERENCIAS.....	39
Anexos.....	44

Abreviaturas.

FBN: Fijación biológica de nitrógeno.

BFN: Bacterias fijadoras de nitrógeno.

CFN: Consorcios microbianos fijadores de nitrógeno.

BBM: Medio basal de bold.

BBMM: Medio basal de bold modificado para fijadores de nitrógeno.

ODS: Objetivos de desarrollo sostenible.

AGVs: Ácidos grasos volátiles

Lista de figuras:

Figura 1: Mapa producción global de algas, 2022.

Figura 2: Ciclo del nitrógeno en bacterias fijadoras.

Figura 3: Unidades experimentales para el cultivo de *BFN*.

Figura 4: Unidades experimentales para el cultivo de *C. sorokiniana*.

Figura 5. Acople entre fijadores de nitrógeno y *C. sorokiniana*.

Figura 6. Cultivo inicial y final de *Chlorella Sorokiniana*, en configuración 3.

Figura 7. Etapa 1: Curvas de tendencia del cultivo NR en medio BBMM.

Figura 8. Etapa 2: Desarrollo de los inóculos S, D y Z en medio sin nitrógeno con fuente de carbono AGVs.

Figura 9. Configuración 1: Crecimiento celular de *C. sorokiniana*.

Figura 10. Configuración 2: Crecimiento celular y consumo de amonio y nitrato de *C. sorokiniana*.

Figura 11. Gráficas boxplot de la configuración 2 de *C. sorokiniana*.

Figura 12. Configuración 3: Crecimiento DO 690 nm y nitrato de *C. sorokiniana*.

Figura 13. Gráficas boxplot de la configuración 3 de *C. sorokiniana*.

Resumen

En este estudio se determinó la viabilidad de utilizar medios de cultivo basados en consorcios fijadores de nitrógeno para el cultivo de *Chlorella sorokiniana*. Las microalgas, aunque prometedoras por su rápido crecimiento, enfrentan limitaciones debido al alto consumo de nutrientes, especialmente nitrógeno. Este estudio evaluó como medios de cultivo tres efluentes de diferentes consorcios bacterianos fijadores de nitrógeno respecto al estándar medio basal de bold. Los resultados demostraron que los consorcios permitieron un crecimiento algal sin el uso de nitrógeno externo, alcanzando hasta el doble de crecimiento y rendimiento en comparación con el control. Al integrar estos dos procesos biológicos, se optimiza el uso de recursos y se reduce la dependencia de fuentes químicas de nitrógeno, proporcionando un enfoque más sostenible y con potencial para ser escalado en bioprocesos industriales.

Palabras clave: Microalgas, *Chlorella sorokiniana*, Consorcio de bacterias, Bacterias fijadoras de nitrógeno, Efluentes, Bioreactores.

1. INTRODUCCIÓN.

Las microalgas, como *Chlorella sorokiniana*, son organismos fotosintéticos de importancia biotecnológica e industrial, por su alta tasa de crecimiento y adaptación, junto con sus diversas aplicaciones, desde la producción de biocombustibles hasta la alimentación humana y animal (Cooper & Smith, 2015; Martindale, 2010; Shitanaka et al., 2024). Sin embargo, su producción a escala comercial enfrenta desafíos asociados a los altos costos de los fertilizantes nitrogenados, los cuales pueden representar hasta el 25% de los costos operativos en cultivos de microalgas (Mateucci, 2018).

La fijación biológica de nitrógeno (FBN), llevada a cabo por bacterias diazótrofes, es una alternativa sostenible al uso de fertilizantes sintéticos (Dong et al., 2023; Soumare et al., 2020). Estudios recientes han demostrado que los consorcios microbianos fijadores de nitrógeno (CFN) generan metabolitos que benefician el crecimiento de microalgas, promoviendo así una simbiosis aprovechable para la producción de biomasa (Aburai et al., 2023; Muthusamy et al., 2023). Sin embargo, estos cultivos mixtos presentan el desafío de la purificación posterior, aumentando su precio o reduciendo sus usos potenciales (Zhang et al., 2020).

En este contexto, el presente estudio tiene el objetivo de evaluar la viabilidad de utilizar el efluente de cultivos de bacterias fijadoras de nitrógeno (BFN) como fuente alternativa de nitrógeno para el crecimiento de *Chlorella sorokiniana*. Este enfoque podría contribuir a la reducción de costos en la producción de microalgas, a la vez que generan ingresos por la venta de las bacterias como inoculante, también se alinea con los principios de la transformación azul y los objetivos de desarrollo sostenible (ODS), promoviendo sistemas de producción más sostenibles y eficientes en el uso de recursos (FAO, 2022). Fortaleciendo el desarrollo de bioprocesos más ecológicos y económicamente viables al ofrecer una doble ventaja económica: reducir la dependencia del nitrógeno sintético mientras se valorizan los subproductos bacterianos.

2. PLANTEAMIENTO Y JUSTIFICACIÓN DEL PROBLEMA.

La población mundial proyecta crecer en 2 mil millones en los próximos 50 años (United Nations, 2024), lo que implica la necesidad de fuentes sostenibles que sustenten el consumo que este crecimiento implica. Las microalgas tienen diversas aplicaciones, gracias a su capacidad para producir biomasa rica en compuestos de alto valor agregado, como proteínas, lípidos, pigmentos y vitaminas esenciales, siendo fundamentales para la seguridad alimentaria (Mobin et al., 2019). Entre las microalgas más comunes en el mercado se encuentra el género *Chlorella*, junto con otras como *Dunaliella salina* o *Arthrospira*, que se comercializa como un suplemento dietético, destacando por su valor nutricional (Shitanaka et al., 2024), por lo cual, desempeñan un papel importante en el logro de varios ODS, como la erradicación de la pobreza, el hambre cero y la acción por el clima (J. Cai, 2021; FAO, 2024).

La producción comercial de microalgas se ve limitada por altos costos y baja biomasa, además, la contaminación por bacterias, protozoos y otras algas, es un desafío para los cultivos monoespecíficos; aunque no compiten por espacio con los sistemas agrícolas, presentan una demanda de nutrientes mayor, (Kumar & Bera, 2020; Markou & Nerantzis, 2013). Los nutrientes representan el 25% de los costos, siendo una barrera económica significativa (Dong et al., 2023; Levens & Sorgeloos, 1996; Mateucci, 2018). Sobre la base de una composición media de microalgas dada por $\text{CO}_{0.48}\text{H}_{1.83}\text{N}_{0.11}\text{P}_{0.01}$, se pueden estimar las necesidades de nitrógeno por unidad de superficie y por año. Esto conduce a

una cantidad de nitrógeno que varía, dependiendo del tipo y condiciones de cultivo, aproximadamente 8 a 16 toneladas N por hectárea por año (Richmond, 2003).

El cultivo con fertilizantes químicos conlleva altos costos de producción, emisiones de gases de efecto invernadero y el agotamiento de recursos naturales (Ortiz Marquez et al., 2014). Estos fertilizantes representan el 2% del consumo energético mundial, produciendo grandes cantidades de óxido nitroso (N_2O), un gas de efecto invernadero. Además, el 25% del nitrógeno aplicado como fertilizante se pierde por lixiviación y otros procesos agrícolas (Soumare et al., 2020).

Según el DANE (2024), el costo promedio de 50 kg de Urea al 46%, está en \$120.000, mientras que el costo de 5 L de biofertilizante a base de azotobacter es aproximadamente \$70.000. Para el cultivo de una hectárea de suelo se requieren 120 kg de urea, mientras que solo se utilizan 3 L de biofertilizante, lo que denota el impacto económico positivo que puede hacer la transición hacia los biofertilizantes (Agroactivo, s. f.; DANE, 2024).

Para optimizar el uso sostenible en la producción de alimentos, es esencial adoptar estrategias innovadoras. En este sentido, el cultivo de microalgas surge como una alternativa, ya que no solo permite obtener biomasa con alto valor nutricional, sino que también contribuye a la captura de carbono, recicla nutrientes, optimiza el uso del agua y puede integrarse en sistemas de acuicultura sostenible, mejorando así la eficiencia y sostenibilidad de estos ecosistemas y al mismo tiempo, al reemplazar los fertilizantes sintéticos con efluentes de consorcios bacterianos, se reduciría el impacto ambiental y se optimiza el aprovechamiento de los nutrientes, alineándose con los principios de la Transformación Azul (FAO, 2022).

Las BFN, convierten el nitrógeno atmosférico en formas utilizables para las plantas y microalgas (Curi et al., 2020). La utilización de consorcios en cocultivo con microalgas reduce los costos de nutrientes, aumenta la producción de biomasa y minimiza el impacto ambiental. No obstante, la mayoría de estas investigaciones se han enfocado en sistemas de cultivo combinado, lo cual implica la pérdida del potencial comercial de las microalgas, dejando un vacío en la exploración del uso del efluente de estas bacterias como fuente de nitrógeno para las microalgas (Zhang et al., 2020). Surge así la necesidad de abordar la

pregunta: ¿Es posible utilizar el efluente producido por BFN para favorecer el crecimiento de microalgas?

3. OBJETIVOS.

3.1. Objetivo general.

- Evaluar el crecimiento de la microalga *Chlorella sorokiniana* utilizando efluentes ricos en Nitrógeno derivados de un consorcio de bacterias diazotrofas.

3.2. Objetivos específicos.

- Establecer las condiciones de operación y alimentación para un consorcio de bacterias fijadoras de nitrógeno.
- Evaluar el uso del efluente proveniente de cultivos inoculados con consorcios de bacterias fijadoras de nitrógeno como fuente de Nitrógeno para la producción de *Chlorella sorokiniana*.

4. ANTECEDENTES.

4.1 Cultivo de microalgas.

Si bien el estudio de las microalgas ha abarcado diversas áreas, como su papel ecológico y su uso alimentario, una línea central de investigación ha sido históricamente la identificación y optimización de las condiciones para su cultivo, con el objetivo de maximizar su crecimiento y productividad.

Desde mediados del siglo XIX, los científicos han explorado el potencial de las microalgas para producir compuestos de alto valor, desarrollando diversos medios de cultivo para maximizar la biomasa y la acumulación de metabolitos (Abalde et al., 1995). La selección del medio adecuado es crucial; por ejemplo, Wong et al. (2017) evaluaron trece medios de cultivo para *Chlorella* y encontraron que el medio Basal de Bold (BBM) ofrecía la mejor tasa de crecimiento ($0.279 \pm 0.001 \frac{1}{d}$) y productividad de biomasa (114.208 ± 0.850 mg/L día), seguido por los medios M-8 y BG11 modificado (Wong et al., 2017).

Otro factor determinante en el crecimiento de las microalgas es la fuente de carbono. Malagón y Suárez (2020) estudiaron la influencia de la concentración de dióxido de carbono y la densidad inicial de *Chlorella vulgaris*. Determinando que la producción máxima de biomasa (3.65×10^7 cel/mL) ocurre con una concentración inicial de $8,01 \times 10^6$ cell/mL y niveles de CO₂ del 0-3% (Malagón & Suárez, 2020). Mientras que Yeh et al, (2010), al realizar cultivo de *Chlorella vulgaris*. con diferentes concentraciones de NaHCO₃, encontraron que era una buena fuente de carbono, obteniendo la mayor cantidad de biomasa (0.6 g/L) con 1 g/L de NaHCO₃ (Yeh et al., 2010).

También el color de iluminación y la intensidad lumínica juegan un papel fundamental en el crecimiento de las microalgas. En un estudio realizado por Theerapisit (2023), se evaluaron los medios de cultivo BG-11, Bold y Chu-13, junto con las intensidades lumínicas de 1,000, 3,000 y 5,000 Lux. Los resultados muestran que el medio BG-11 permitió el mayor crecimiento, con una producción de 1.1×10^6 cel/mL, y una influencia mínima de la luz en su rendimiento. En contraste, en el medio Bold, la intensidad lumínica tuvo un efecto más marcado, donde la mejor respuesta se obtuvo a 3,000 Lux, con un crecimiento de 0.97×10^6 cel/mL. En el caso del medio Chu-13, la mayor eficiencia se observó a 5,000 Lux, logrando un crecimiento de 1.07×10^6 cel/mL (Theerapisit et al., 2023). Estos hallazgos destacan la importancia del medio de cultivo y su interacción con la intensidad lumínica, mostrando el impacto directo en la productividad de biomasa y en la optimización de los sistemas de cultivo de microalgas.

4.2 Consorcios para producir inoculantes.

El nitrógeno es un elemento esencial para el crecimiento de los cultivos, lo que ha impulsado la búsqueda de métodos sostenibles y eficientes para su producción, con lo cual surge el concepto de bionitrógeno, obtenido mediante la FBN. Aunque tradicionalmente la investigación se ha centrado en cultivos axénicos de BFN, recientemente ha aumentado el interés en los consorcios microbianos. Estas comunidades de microorganismos, gracias a sus interacciones, han demostrado ser una estrategia prometedora para mejorar la fijación de nitrógeno y optimizar su disponibilidad para los cultivos (Rodríguez et al., 2024).

Entre los estudios sobre cultivos axénicos destaca el de Gutiérrez-Rojas et al. (2011), en el cual se cultivó *Azotobacter chroococcum* evaluando distintos sustratos de carbono, como

sacarosa, manitol, glucosa y benzoato de sodio, junto con fuentes de nitrógeno, entre ellas extracto de levadura, cloruro de amonio y sulfato de amonio. Los resultados indicaron que la combinación de sacarosa y extracto de levadura fue la más eficiente, favoreciendo un crecimiento significativamente mayor. A través de un análisis de superficie de respuesta, se establecieron las concentraciones óptimas de 13.06 g/L de sacarosa y 3.70 g/L de extracto de levadura, lo que generó un aumento del 150% en la producción de biomasa en comparación con el control (Gutierrez-Rojas et al., 2011).

Uno de los primeros estudios que evaluó las condiciones óptimas para la fijación de nitrógeno en consorcios microbianos fue realizado por Arroyo (2017). En su investigación, analizó la producción de nitrógeno en un reactor por lotes, examinando el efecto de diferentes concentraciones de carbono y flujos de oxígeno. Los resultados indicaron que las variaciones en la concentración de sacarosa no afectaron significativamente el nitrógeno total Kjeldahl, y que el nitrato era la única forma de nitrógeno detectable. Se encontró que, al emplear la mayor concentración de sacarosa (25 g/L) y el menor flujo de aire (1.875 L/LRmin), se lograron las mayores concentraciones de nitrógeno total y fijado, alcanzando 80 y 100 mg N/L, respectivamente. Estos hallazgos resaltan la importancia de optimizar las condiciones del medio para maximizar la fijación de nitrógeno en consorcios microbianos (Arroyo, 2017).

El potencial de los consorcios microbianos como biofertilizantes ha sido respaldado por estudios como el de Muthusamy et al. (2023), en donde demostraron que combinaciones de *Azotobacter*, *Azospirillum* y *Rizobacter* pueden sustituir eficazmente a los fertilizantes químicos convencionales. Estos consorcios mejoran la fertilidad del suelo y aumentan el rendimiento de los cultivos mediante la fijación de nitrógeno, mostrando mayor efectividad en comparación con tratamientos individuales (Muthusamy et al., 2023).

Rodríguez et al. (2024) ampliaron estos hallazgos evaluando diferentes fuentes de carbono para optimizar el crecimiento y la fijación de nitrógeno en consorcios microbianos. Su estudio reveló que los cultivos enriquecidos con ácidos grasos volátiles (AGVs) superaron a los que utilizaban glucosa-manitol, alcanzando hasta 40 mg N/mL en su efluente y 12 mg N/mL en el sobrenadante. Además, la biomasa obtenida se aplicó en la producción de tomates, logrando rendimientos similares a los fertilizantes nitrogenados químicos,

mostrando una alternativa sostenible a los fertilizantes tradicionales (Rodríguez et al., 2024).

4.3 Cocultivo de microalgas con fijadores.

Desde hace décadas, los científicos han estudiado la coexistencia de microalgas y bacterias en ambientes acuáticos naturales, donde establecen relaciones simbióticas mediante diversos mecanismos de cooperación. Estas interacciones se derivan del intercambio de nutrientes y metabolitos que benefician a ambos organismos (Tong et al., 2023).

Uno de los primeros estudios de laboratorio sobre esta interacción fue realizado por Scott en 1974, quien analizó la relación entre *Chlorella* y *Azotobacter*. Sus experimentos demostraron que la asociación entre ambos organismos estimulaba su crecimiento mutuo: *Azotobacter* aprovechaba los exudados de *Chlorella*, mientras que la microalga aumentaba su producción de proteínas y clorofila. Además, Scott descubrió que las bacterias no solo influyen en la concentración de exudados en el medio, sino que también liberan compuestos orgánicos con efectos estimulantes o inhibidores sobre el crecimiento de las microalgas (Scott, 1975).

En los últimos años, el interés por estos sistemas ha crecido, impulsando estudios más detallados que consolidan el cocultivo de microalgas y BFN como una alternativa prometedora en biotecnología. En este contexto, Dong et al. (2023) investigaron la producción de biomasa de *Chlorella pyrenoidosa* en cocultivo con *Azotobacter beijerinckii*, comparando tres formas de aplicación de esta bacteria: sobrenadante bacteriano, bacterias vivas y bacterias fragmentadas. Los resultados indicaron que todas las variantes incrementaron la biomasa en comparación con el cultivo puro de *C. pyrenoidosa*. No obstante, la aplicación de bacterias fragmentadas fue la estrategia más eficiente, logrando una biomasa de 34,9 g/L, un incremento del 71.8% respecto al control, además de aumentar el contenido proteico en un 28.2% (Dong et al., 2023).

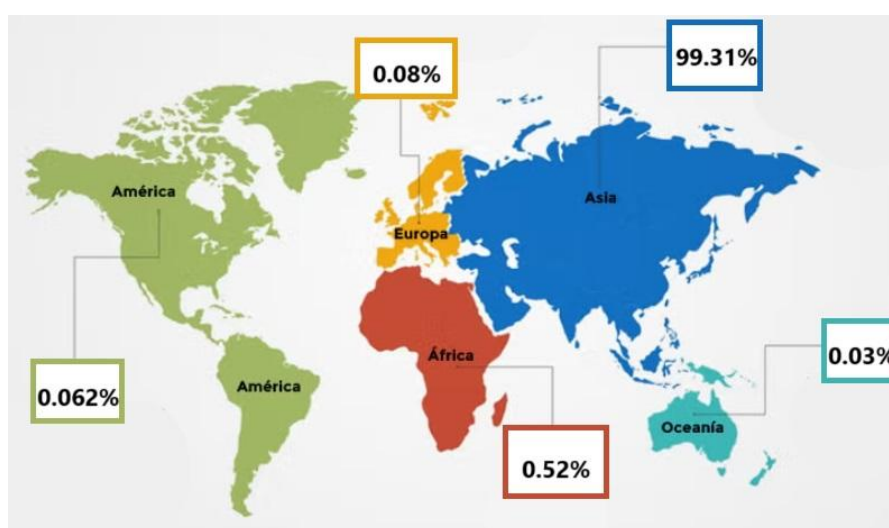
El suministro de carbono y nitrógeno es fundamental para el crecimiento y metabolismo de microalgas y BFN. Aburai et al. (2023) investigaron el impacto de estos elementos en el cocultivo de *Coelastrella sp.* y *Rhodobacter Sphaeroides*, utilizando el medio Basal de Bold Modificado (BBMM), con y sin la presencia de nitrógeno o carbono. Los resultados

mostraron que la adición de una fuente de nitrógeno mejoraba su fijación, estableciendo una relación comensal mutualista. Las microalgas liberaron carbohidratos que eran utilizados por las bacterias, mientras que *R. sphaeroides* fijaba nitrógeno en el sistema. Además, el estudio confirmó que el medio BBMM era adecuado para el crecimiento de esta BFN (Aburai et al., 2023).

5. MARCO TEÓRICO Y CONTEXTUAL.

5.1 Importancia de las microalgas en la Economía.

El mercado de microalga, aunque actualmente pequeño debido a los altos costos operativos y de capital, está en crecimiento constante (Xu et al., 2024). El tamaño del mercado de alimentos acuícolas a base de microalgas se valoró en 239,70 millones de dólares en 2022 y se prevé que crezca de 257,20 millones de dólares en 2023 a 433,08 millones de dólares en 2030 (Fortune Business Insights, 2022). En 2022, se produjeron 36 millones de toneladas de algas, con China como el mayor productor, seguida por África y Europa como se observa en la fig 1 (FAO, 2024).



Fuente de datos: El estado mundial de la pesca y acuicultura 2024 (FAO, 2024).

Figura 1: Mapa producción global de algas, 2022.

5.2 Nutrición y Costos de Producción de microalgas.

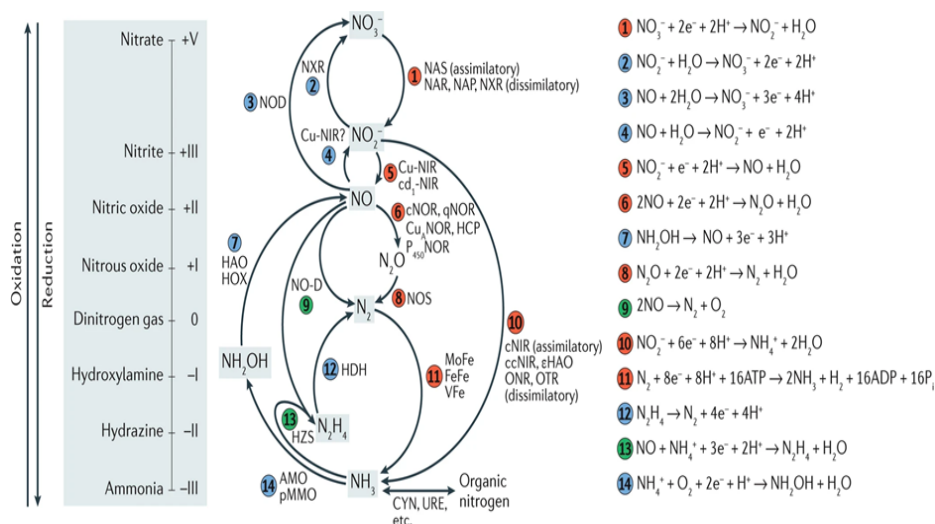
El medio de cultivo es un elemento que tiene influencia directa en el costo de producción de las microalgas, con lo cual abaratar estos costos reduciría su valor de producción (Hernández et al., 2022). Para lograr un crecimiento algal se necesitan nutrientes como dióxido de carbono, nitrógeno, fósforo, azufre e iones metálicos traza. El nitrógeno es

fundamental para el crecimiento y metabolismo celular, constituyendo aproximadamente el 10% de la masa seca de la biomasa (Y. Cai et al., 2022). Se asimila a partir de fuentes como nitrato, nitrito, amonio o urea (Mateucci, 2018). Se estima que se necesitan 2.5 toneladas de urea por hectárea al año para una producción continua en granjas acuáticas al aire libre (Ortiz Marquez et al., 2014). Los precios promedio de primera venta fueron de 0.47 USD/kg para algas pardas, 0.39 USD/kg para algas rojas y 0.79 USD/kg para algas verdes, alcanzando un valor de mercado de 14.85 mil millones de dólares, superando a ciertos peces como la tilapia (J. Cai, 2021).

5.3 Fijación biológica de Nitrógeno.

El proceso de producción de bionitrógeno, generado por BFN atmosférico, es una fuente utilizable como biofertilizante. Este proceso es mediado por bacterias de vida libre de géneros como *Azotobacter*, *Azospirillum*, *Bacillus* o *Clostridium* entre otras; bacterias simbióticas como *Rhizobium*, que se asocia con *leguminosas*; *Frankia*, asociada a plantas *actinorrícicas*; y *cianobacterias*, que forma asociaciones con *cícadas* (Soumare et al., 2020).

El ciclo de la fijación de nitrógeno, representado en la fig 2, es un proceso en el que la enzima nitrogenasa transforma el nitrógeno atmosférico en una forma simple, soluble y no tóxica, generalmente en amonio (NH_4^+). Esta reacción es catalizada por complejos enzimáticos que dependen de metales esenciales como molibdeno (Mo), hierro (Fe) y vanadio (Va). Posteriormente, las bacterias nitrificantes convierten el amonio en nitrito (NO_2^-) y, en una segunda etapa, en nitrato (NO_3^-). Finalmente, otras bacterias llevan a cabo la desnitrificación, transformando el nitrato en nitrógeno gaseoso (N_2), que regresa a la atmósfera, cerrando así el ciclo (Kuypers et al., 2018).



Fuente: Nature Review (Kuypers et al., 2018)

Figura 2: Ciclo del nitrógeno en bacterias fijadoras.

La creciente demanda de prácticas agrícolas sostenibles ha impulsado el uso de biofertilizantes e inoculantes agrícolas, basados en microorganismos como bacterias fijadoras de nitrógeno. Se estimó que el mercado mundial de biofertilizantes alcanzaría un valor de 3.27 mil millones de dólares en 2024, con una proyección de crecimiento a 5.23 mil millones para 2029 (Mordor Intelligence, 2023). Paralelamente, el mercado de inoculantes agrícolas, que incluye productos microbianos para la mejora de cultivos, se valoró en 867 mil millones de dólares en 2019 y se espera que alcance los 3.3 mil millones de dólares para 2032 (Fortune Business Insights, 2019). Este crecimiento resalta la importancia de métodos sostenibles para el enriquecimiento de suelos en la agricultura moderna. Las ventajas incluyen un menor consumo energético y la mejora de la fertilidad del suelo, aunque presentan una menor tasa de producción en comparación con los fertilizantes químicos, y su efectividad depende de factores ambientales y de organismos específicos (Cherlinka, 2022).

Dentro de los biofertilizantes, la BFN *Azotobacter* ha demostrado un potencial significativo para mejorar la disponibilidad de nitrógeno en el suelo, reduciendo la necesidad de fertilizantes químicos. Algunas de las empresas que producen biofertilizantes son Natural Resources, utiliza *Azotobacter chroococcum*, Agri Life, a base de *Azotobacter vinelandii* y ubicada en Colombia la empresa Biocultivos, que trabaja con *Azotobacter chroococcum*. (Aasfar et al., 2021)

6. MATERIALES Y MÉTODOS.

6.1. Origen de los Inóculos.

a. CFN. Fijadores de Nitrógeno

- Consortio NR: Cultivo autoensamblado mantenido en el laboratorio de Microbiología y Biotecnología Ambiental producto de un proceso de enriquecimiento y selección sistemática a partir de rizosfera de tomate, inoculado con una mezcla de Ácidos grasos Volátiles como fuente de carbono y trazas de nitrógeno en su medio (Rodríguez et al., 2024)
- Consortio S: Suelo con poco tratamiento o uso de pesticidas, recolectado en la Universidad del Valle (3°22'37.1"N 76°31'56.2"W), tomando 1g e inoculado directamente en medio BBMM sin nitrógeno, ver apartado medios de Cultivo.
- Consortio D: Mezcla de suelo de diferentes ambientes de la universidad del Valle, buscando una mayor diversidad bacteriana, inoculado inicialmente en medio DSMZ—Medium 441 y luego transferidas a medio BBMM sin nitrógeno, ver apartado medios de Cultivo.

b. *Azotobacter Vinelandii* (Z).

Como control para los CFN se utilizó la cepa pura, de *Azotobacter Vinelandii* (ATCC 478), adquirida y por el laboratorio de Microbiología y Biotecnología Ambiental, reconocida por su eficiencia en fijación de nitrógeno, mantenida en cultivo axénico a -20 °C y utilizada como control positivo.

c. *Chlorella sorokiniana*.

La cepa pura de *C. sorokiniana* se obtuvo del laboratorio de microbiología de la Universidad ICESI. Esta cepa fue previamente inoculada en medio BBM bajo condiciones axénicas para garantizar su viabilidad y pureza, verificada por observación directa con uso de un microscopio MicroMaster de Fisher Scientific.

6.2. Montaje y operación de Bioreactores.

6.2.1. Unidad Experimental para el crecimiento de fijadores Nitrógeno.

Consistió en vasos de vidrio con un volumen total de 1.2 L y un volumen de trabajo de 750 mL. Con una manguera para la alimentación y toma de muestras, que se dotó con válvula, sellada con filtro para venoclisis que a su vez se protegió con papel aluminio. Una entrada para el aire con un flujo aproximado de 0,3 L/min, y una salida para escape de presión de gas, dotadas con filtros de 0.22 μm para control de contaminación, ver fig 3a. El aire atmosférico rico en Nitrógeno molecular (78%), se impulsó hacia los reactores usando bombas RESUN AC9904. Para reforzar la eliminación de posibles contaminantes contenidos en el aire, este se hizo pasar primero por una cámara cerrada dotada con una lámpara de luz ultravioleta y filtros de algodón impregnados con peróxido de sodio, ver fig 3b.

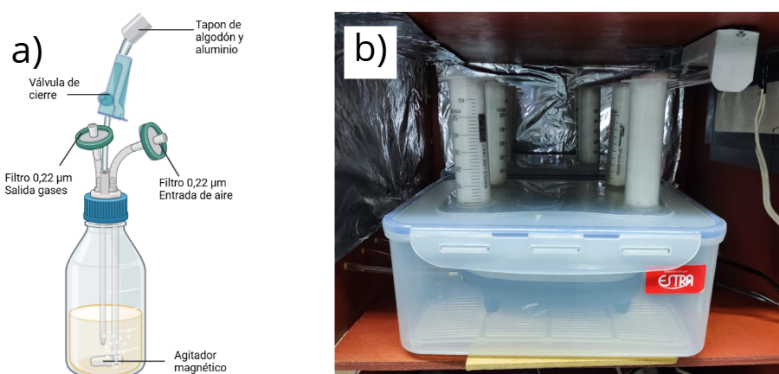


Figura 3. Unidad experimental para el cultivo de BFN. **a)** Unidad experimental para los ensayos con consorcios fijadores de Nitrógeno: Biorreactor operado manualmente con salidas y entrada de aire y nutrientes. **b)** Caja para esterilizar el aire, dotada de lámpara UV y filtros de algodón impregnada con peróxido de hidrógeno.

6.2.2. Unidad Experimental para el crecimiento de *C. sorokiniana*.

Para el cultivo de microalgas, se utilizaron dos unidades experimentales distintas, cada una con características específicas que garantizaban condiciones controladas y estériles. Ambas unidades experimentales fueron operadas bajo un régimen de fotoperíodo continuo de 24 horas.

- Unidad Experimental 1: Viales de Vidrio.

La primera unidad experimental consistió en viales de vidrio con un volumen total de 10 mL y un volumen de trabajo de 3 mL. Estos viales fueron cerrados con tapa de rosca. (ver Fig. 4a).

- Unidad Experimental 2: Biorreactores de Vidrio.

La segunda unidad experimental consistió en biorreactores de vidrio de 120 mL de volumen total y 75 mL de volumen útil. Cada uno incluía una manguera para la toma de muestras, con una válvula de control sellada con un filtro para venoclisis y protegida con papel aluminio. La oxigenación y mezcla del medio se lograron mediante una entrada de aire con un flujo aproximado de 0.1 L/min y una salida para el escape de presión, cada una equipada con filtros de 0.22 μm (ver Fig. 4b). El aire se filtró previamente con algodón impregnado con peróxido de sodio y se bombeó desde una caja cerrada con luz ultravioleta, garantizando un entorno estéril adecuado para el desarrollo de las microalgas (ver Fig. 3b).

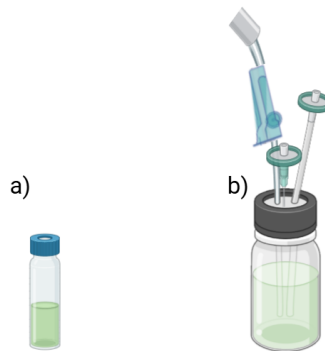


Figura 4: Unidades experimentales para el cultivo de *C. sorokiniana*. **a)** Unidad experimental 1. Viales de vidrio con tapa rosca con *volumen total de 10 mL* y *volumen de trabajo de 3 mL*; **b)** Unidad experimental 2. Frasco de vidrio, con entrada y salida de aire y manguera para toma de muestras, con *volumen total de 120 mL* y *volumen de trabajo de 75 mL*.

6.2.3. Diseño de los experimentos y parámetros de operación de los biorreactores.

6.2.3.1. Estrategia Operativa de los Biorreactores en el Cultivo de Fijadores de Nitrógeno.

Los cultivos se realizaron en reactores operados bajo el esquema de lotes secuenciales (*Sequential Batch Reactor*, SBR), con recambios del 50% del volumen del medio cada siete días para asegurar la renovación constante de nutrientes esenciales, estos recambios se

realizaron en una cabina biológica de flujo laminar. La temperatura del sistema se mantuvo en un rango de 26 a 28 °C.

Etapa 1:

El objetivo de esta etapa fue evaluar la respuesta en el crecimiento del consorcio bacteriano en un entorno controlado a largo plazo, determinando su eficacia y su variabilidad. Se realizaron seis réplicas del consorcio NR (sección 6.1), junto con un control positivo con *Azotobacter* (**Z**) y un control negativo sin inoculación (Blanco). Cada reactor fue inoculado con 1 mL del consorcio en 749 mL de medio BBMM. Esta etapa se llevó a cabo durante un periodo de 74 días, en los que se realizaron 269 medidas. Inicialmente, el medio contenía 0.04 g de NH₄Cl, reduciéndose a la mitad en el tercer recambio y eliminado completamente en los siguientes.. Este enfoque permitió analizar la respuesta de los microorganismos ante la disminución progresiva de nitrógeno en el medio.

Etapa 2.

Esta etapa permitió evaluar la capacidad de los consorcios bacterianos para fijar nitrógeno, utilizando como única fuente el aire suministrado. Se inocularon 20 mL de los consorcios **S** y **D**, junto con los controles positivo (*Azotobacter*, **Z**) y negativo sin inocular. Se empleó el medio de cultivo diseñado sin fuentes de nitrógeno, con AGVs como fuente de carbono, que cuenta con los nutrientes Mo, Fe y Va, bases para la FBN, junto con macro y micro nutrientes presentes en la mayor parte de los medios de cultivo para BFN (Anexo, tabla 4). Se mantuvo el sistema en operación durante 30 días en los cuales se recolectó un total de 60 muestras. La homogeneización del medio se logró mediante agitadores magnéticos en planchas de agitación a 600 rpm, para evitar la formación de cúmulos. El efluente de los consorcios de cada recambio fue esterilizado en autoclave para evitar la presencia de microorganismos y almacenado en refrigeración para su posterior uso en ensayos de crecimiento de *C. sorokiniana*.

6.2.3.2. Diseño Experimental para el Cultivo de *C. sorokiniana*.

Estas configuraciones experimentales fueron diseñadas para evaluar la capacidad de *C. sorokiniana* para crecer en diferentes condiciones, con el objetivo principal de determinar la eficiencia de los efluentes de BFN como fuente de nitrógeno.

Se establecieron tres configuraciones experimentales, ilustradas en la fig 5. Todas las configuraciones fueron operadas en cultivo por lotes con fotoperiodo continuo de 24 horas proporcionando una iluminación constante que favorece la actividad fotosintética.

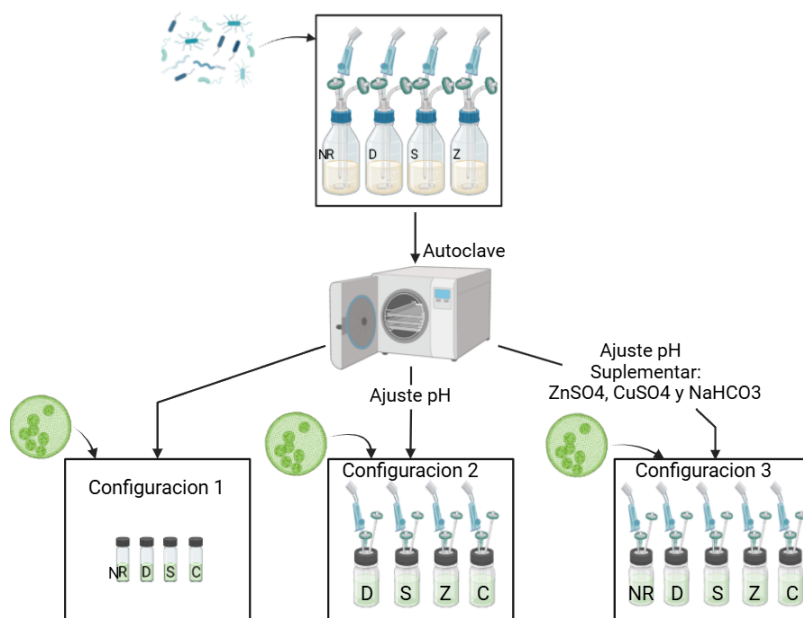


Figura 5. Acople entre fijadores de nitrógeno y *C. sorokiniana*. Se ilustran los cultivos de consorcios fijadores designados como NR, D y S, junto con el cultivo puro Z (*Azotobacter*) y su posterior utilización del efluente como medio de cultivo para *C. sorokiniana*, en donde C corresponde al medio control BBM para la microalga.

- Configuración 1: Se realizó un cultivo de tres días, con la unidad experimental 1 (sección 6.22), inoculando 0.1 mL de *C. sorokiniana*, con promedio de 40 cel/ μ L, utilizando el medio de cultivo BBM y los efluentes NR, S y D, de los cuales se tomó un total de 3 muestras para cada uno. Este diseño permitió evaluar la respuesta inicial de las microalgas a cada medio.
- Configuración 2: Los reactores fueron inoculados con 1 mL de *C. sorokiniana*, en los efluentes S, D y Z, además del medio BBM y un blanco sin inocular. La selección de este volumen de inoculación permitió un monitoreo detallado del crecimiento microalgal mediante conteo celular, facilitando la evaluación de la fase inicial del desarrollo de la biomasa. El experimento se llevó a cabo durante 9 días, tomando muestras al inicio y al final del ensayo.

- Configuración 3: Se incrementó el volumen de inoculación de *C. sorokiniana* a 7.5 mL y se utilizó como medio de cultivo los efluentes S, D, Z, NR y el medio BBM, tomando en total 9 muestras de cada cultivo. Este cultivo favoreció un crecimiento más robusto, facilitando su adaptación, este montaje se puede observar en la fig 6.

En la segunda y tercera configuración, se utilizó la unidad experimental 2 (sección 6.2.2), en donde se implementó una aireación constante de 0.1 L/min para mantener la homogeneidad del medio, favoreciendo la estabilidad del cultivo y la disponibilidad de nutrientes. Si bien el CO₂ es la fuente de carbono óptima para los cultivos de microalgas, en este estudio se utilizó bicarbonato de sodio para mantener un control más preciso en condiciones de laboratorio.



Figura 6. Cultivo inicial y final de *Chlorella Sorokiniana*, en configuración 3.

6.2.4. Medios de Cultivo.

- **BBMM:** Diseñado para ofrecer las condiciones necesarias para un crecimiento eficiente de las BFN. Su composición incluye (g/L): ácido succínico, 1; acetato de sodio, 1; glucosa, 3; NH₄Cl, 0.04; K₂PHO₄, 0.375; KH₂PO₄, 0.9; MgSO₄·7H₂O, 0.025; FeSO₄·7H₂O, 0.005; ZnSO₄·7H₂O, 0.009; Cu₂SO₄·5H₂O, 0.002; NaCl, 0.025; KOH, 0.031; H₃BO₃, 0.0114; EDTA, 0.05; MnCl₂·4H₂O, 0.00144; Na₂MoO₄, 0.0007; CoCl₂·6H₂O, 0.0004. Estos componentes se disolvieron en 1 Litro de agua desionizada para garantizar la homogeneidad del medio. El pH se ajustó a un rango de 7 a 7.5 (Aburai et al., 2023).

- Medio sin nitrógeno para BFN:** Este medio fue diseñado con base en revisión de literatura y medios consolidados en una base de datos interna (Anexo, tabla 4). La formulación se diseñó considerando las necesidades nutricionales de las bacterias fijadoras de nitrógeno, asegurando un entorno adecuado para su crecimiento y la actividad de la enzima nitrogenasa. Además, se consideraron cantidades de compuestos no nocivos para microalgas, asegurando una composición que permita el crecimiento de ambos organismos. La composición del medio incluye los siguientes componentes (g/L): KH_2PO_4 , 2; MgSO_4 , 0.2; CaSO_4 , 0.1; NaVO_3 , 0.0001; FeSO_4 , 0.05; $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 0.0005; $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 0.00001; MnSO_4 , 0.005; $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.0002; H_3BO_3 , 0.0001; $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 0.005; $\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 0.00002. Como fuentes de carbono, se emplean ácidos grasos volátiles en las siguientes proporciones (ml/L): ácido acético, 0.63; ácido propiónico, 0.103; ácido butírico, 0.168; ácido valérico, 0.04; ácido isobutírico, 0.056. Esta composición simula la encontrada en el procesamiento de estiércol de cerdo, que como ha sido demostrado proporciona una fuente de carbono eficiente y compatible con el metabolismo de las BFN. El pH se ajustó a un rango de 7 a 7.5.
- Medio Basal de Bold para microalgas - BBM:** Para los cultivos de *C. sorokiniana*, se empleó el medio BBM. Este medio incluyó (g/L): NaNO_3 , 0.250; K_2PHO_4 , 0.075; KH_2PO_4 , 0.175; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.075; $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.00882; $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, 0.00157; $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.005; EDTA, 0.05; KOH, 0.031; H_3BO_3 , 0.01142; $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, 0.00144; $\text{NaMoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 0.0012; $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 0.025; NaCl, 0.025; $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 0.0004. El pH del medio se ajustó a 7.2. Se utilizó bicarbonato de sodio a una concentración de 1.1 g/L, como fuente de carbono (Yeh et al., 2010). Estos componentes se disolvieron en 1 L de agua desionizada, siguiendo protocolos establecidos (Nichols & Bold, 1965; Wong et al., 2017).

Los medios de cultivo fueron esterilizados mediante autoclave a 121°C y 15 psi durante 20 minutos, antes de su uso en los experimentos.

6.2.5. Variables físicoquímicas.

Para la evaluación del crecimiento bacteriano, se midió la densidad óptica (DO) a 600 nm, utilizando un espectrofotómetro UV-Vis (Hoefer SP-2001), en el caso de *C. Sorokiniana* se midió a 690 nm, lo que permite identificar la clorofila como un indicador directo del

crecimiento de las microalgas. Para la evaluar la disponibilidad y consumo de nitrógeno se utilizó el espectrofotómetro IRIS HI 801 de la marca Hanna, utilizando los siguientes kits de medición: HI93767A-50 para nitrógeno total bajo rango; HI93766-50 para nitrato mediante un sistema colorimétrico y HI93764A-25 para amonio bajo rango. La concentración de AGVs, se evaluó mediante cromatografía de gases con una columna FFAP. El conteo celular, se realizó con una cámara de Neubauer y un microscopio Micromaster. Para el conteo de unidades formadoras de colonias (UFC) se realizó cultivos en cajas petri utilizando diluciones 10^{-3} , 10^{-4} y 10^{-5} , dejando incubar por periodos de 48 horas.

6.3. Análisis estadístico.

El experimento con *C. sorokiniana* se realizó bajo un modelo completamente al azar para los 5 medios de cultivo utilizados. El conteo celular y la DO, fueron las variables de respuesta. Se verificaron los supuestos de normalidad y homogeneidad de varianzas mediante las pruebas de Shapiro-Wilks y Bartlett ($p < 0.05$). En los datos normalizados, se aplicó ANOVA con prueba de Tukey ($p < 0.05$), mientras que en los no normalizados se utilizó Kruskal-Wallis y Dunn ($p < 0.05$). Estos análisis se realizaron utilizando Python en Google Colab, empleando la biblioteca `scipy.stats` con las funciones `shapiro()` para la prueba de Shapiro-Wilks, `bartlett()` para la prueba de Bartlett, `f_oneway()` de `statsmodels.api` para ANOVA, `pairwise_tukeyhsd()` de `statsmodels.stats.multicomp` para la prueba de Tukey, `kruskal()` para Kruskal-Wallis y `posthoc_dunn()` de `scikit-posthocs` para la prueba de Dunn.

6.4. Expresiones matemáticas.

6.4.1. Tasa de crecimiento.

Con el fin de caracterizar el crecimiento celular durante la fase exponencial de los cultivos, se calculó la tasa de crecimiento a partir de la Ec. 1; donde x_t fue el crecimiento final de la fase exponencial y x_0 el inicial.

Ec1.

$$u(d^{-1}) = \frac{\ln(x_t) - \ln(x_0)}{t_t - t_0}$$

6.4.2. Rendimiento de producción.

Con el fin de evaluar la eficiencia de conversión del sustrato, se calculó el rendimiento a partir de la relación entre la producción y el consumo de sustrato, según la Ec. 2. En este estudio, esta fórmula se aplicó tanto para el rendimiento de producción de nitrógeno en las bacterias fijadoras como para el rendimiento de biomasa en *C. sorokiniana*. En la ecuación x_t representó la producción final y x_0 la inicial, mientras que s_0 y s_t representaron las concentraciones inicial y final del sustrato, respectivamente.

Ec2.

$$Y = \frac{x_t - x_0}{s_0 - s_t}$$

6.5. Comparación de costos de los medios utilizados para *Chlorella sorokiniana*.

Se llevó a cabo un análisis comparativo de costos entre el medio control BBM y los medios alternativos: efluente del medio sin nitrógeno enriquecido y el medio BBMM enriquecido. El objetivo de este análisis es evaluar la viabilidad económica del uso de efluentes como alternativa para el cultivo de *C. sorokiniana*. Los costos de preparación de cada medio fueron calculados considerando la composición y cantidad de reactivos empleados, tomando los precios unitarios de la base de datos del Laboratorio de Microbiología de la Universidad del Valle. A partir de esta información, se extrapola el costo por litro de solución, cuyos resultados se presentan en el Anexo (Tabla 1).

7. RESULTADOS Y ANÁLISIS.

7.1. Etapa 1. Crecimiento de CFN preadaptadas en medio BBMM con y sin nitrógeno.

El crecimiento celular del consorcio fijador de nitrógeno previamente obtenido en el laboratorio, y su producción de Nitrógeno (-DO a 600 nm)(N.Total),

Se evaluaron a lo largo de 70 días, en seis réplicas de cultivos bacterianos, comparando con la bacteria de referencia *Azotobacter* y un control negativo. El medio inicial contenía 0.4 g/L de NH_4Cl como fuente de nitrógeno, lo que corresponde a 10.5 mg/L de N, esta cantidad fue reducida en el medio nutritivo a la mitad en el tercer recambio. En las siguientes alimentaciones el medio carecía de una fuente de nitrógeno, esto con el fin de

tener un consorcio autosuficiente en la producción de nitrógeno, dicho en otras palabras un consorcio fijador de nitrógeno eficiente. Como se observa en la figura 7, el crecimiento se afectó drásticamente al disminuir el nitrógeno en el medio, en cinco de las repeticiones. Al eliminar el Nitrógeno adicionado, incluso la repetición que presentó una mayor productividad en las primeras fases del cultivo, no pudo sostener la acumulación de Nitrógeno, lo cual indica que estos consorcios perdieron los grupos de especies responsables de la fijación de Nitrógeno, capaces de sobrevivir sin nitrógeno combinado.

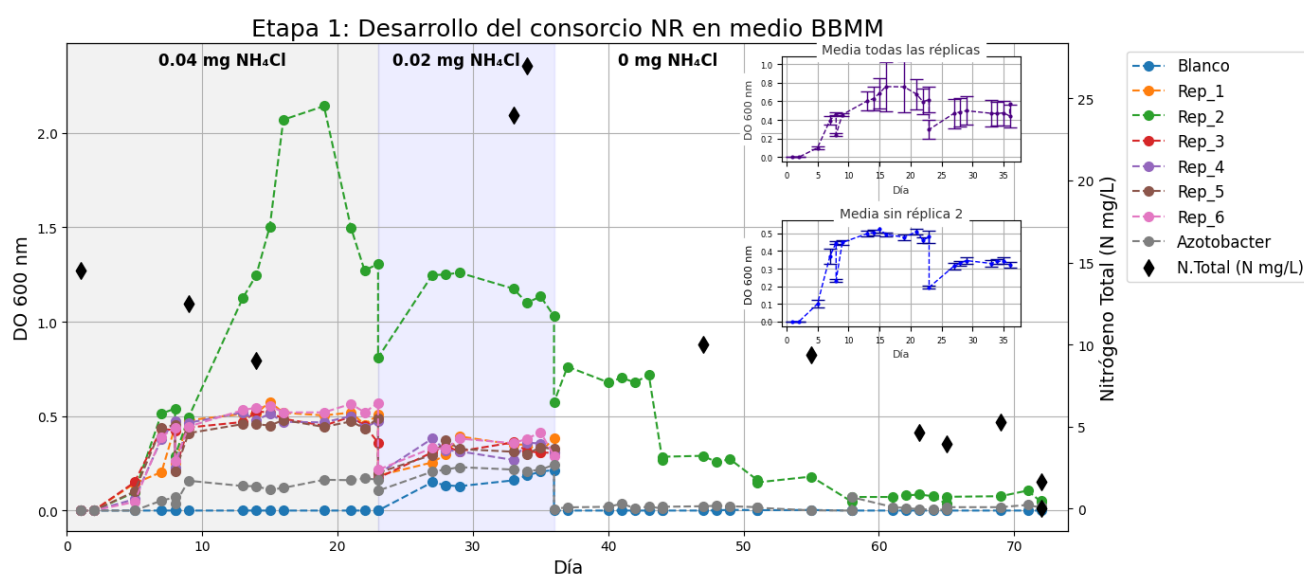


Figura 7. Etapa 1: A) Crecimiento celular de los cultivos con adición de diferentes concentraciones de NH₄CL al medio. Condición 1 Zona gris (0,04MG); Condición 2 Zona Azul (0,02MG); condición tres Zona blanca (0MG). Línea verde: Repetición atípica, con una alta tasa de crecimiento. B) Desviación calculada comparando todas las réplicas. C). Desviación calculada sin réplica atípica. Los rombos en negro representan la cantidad de nitrógeno total en la réplica 2.

Teniendo en cuenta que la bacteria de referencia *Azotobacter* tuvo un crecimiento semejante especialmente en las condiciones dos y tres del cultivo (fig 7), y que los análisis previos aportados por el laboratorio, reflejan la presencia de bacterias fijadoras en la composición del consorcio de origen, es probable que el proceso de obtención de este consorcio se haya dirigido a bacterias con características análogas a *Azotobacter* y que los demás miembros del consorcio no podía aportar. Aunque *Azotobacter* spp, es reconocida por su capacidad de fijar nitrógeno atmosférico mediante la actividad de la enzima nitrogenasa, nuestros

resultados confirman que su crecimiento se ve comprometido en medios totalmente carentes de fuentes de nitrógeno inorgánico o orgánico. Esto se debe al alto costo energético que implica la fijación de N_2 , un proceso que consume al menos 16 moléculas de ATP por cada molécula de nitrógeno fijada, además de requerir poder reductor (NADH o ferredoxina) y condiciones microaerofílicas para proteger la nitrogenasa de la inactivación por oxígeno (Dixon & Kahn, 2004). En ausencia de fuentes accesibles de nitrógeno, *Azotobacter* necesita activar toda la maquinaria de fijación, lo que retrasa su fase de crecimiento exponencial mientras acumula energía y cofactores esenciales como el complejo hierro-molibdeno (FeMo-co) (Sadoff, 1975). Asimismo, la alta tasa respiratoria utilizada por la célula para mantener un microambiente anóxico también demanda recursos metabólicos significativos (Poole & Hill, 1997). Por ello, aunque metabólicamente capaz de fijar nitrógeno, *Azotobacter* muestra un crecimiento inicial limitado en condiciones estrictamente libres de nitrógeno, fenómeno ya reportado en estudios de fisiología comparada de bacterias diazótrofes (Sabra et al., 2000).

Estos resultados también pusieron en evidencia que el efecto de presión selectiva durante el proceso de autoensamblaje o enriquecimiento, que para el caso específico de este consorcio fue hecho para un proyecto dirigido a suplementar de Nitrógeno el suelo, juega un papel determinante. Así para aplicaciones posteriores es fundamental pensar en la aplicación desde el momento mismo de la adaptación del consorcio.

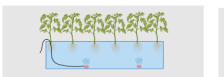
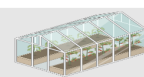
													
	RI	-3	-4	-5	-6	-7	MC	C-	AZO	BIOM	C-	AZO	BIOM
<i>Sinirhodobacter</i>	0.8	61	57.5	56.5	53.8	57.5	44.4	0.8	0.6	0.5	0.5	0.5	0.8
<i>Gordonia</i>	0.3	21.9	15.4	14.1	26.2	19.3	1.4	0.5	0.4	0.2	0.2	0.3	0.6
<i>Pseudoxanthomonas</i>	0.1	0.9	0.6	1.1	2.2	4.5	3.1	15.3	11.9	5.8	0.1	0.1	0.2
<i>Streptomyces</i>	2.3	0	0	0.1	0.1	0.1	0	0	0	0	17.8	13.8	8.7
<i>Olivibacter</i>	0.1	4.9	13.1	14.6	3.8	0.1	0	0	0	0	0	0	0
<i>Pseudomonas</i>	0.1	0.1	0.1	0.1	0.3	0.2	3.7	3.5	2.8	20.4	0.2	0.2	0.2
<i>Azospirillum</i>	0.2	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	2.4	23.8	1.1	0.1	0.2	0.1
<i>Ohtaekwangia</i>	0.7	0	0	0	0	0	0	7.3	5.7	4.7	1.6	1.5	1.6
<i>Klebsiella</i>	0	0.9	0.4	0.1	0	9.8	0	6.2	4.8	0	0	0	0
<i>Gaiella</i>	7.8	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3.9	4.7	5.8
<i>Pseudolabrys</i>	8.2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	4.1	4.3	5.1
<i>Chthoniobacter</i>	4.4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	4.2	5.2	5.7
<i>Aureimonas</i>	0.1	0.2	0.1	0.1	0.3	0.1	17.7	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.2
<i>Devosia</i>	0.9	0.3	0.3	0.2	0.4	0.1	7	0.6	0.5	0.9	2.4	1.9	1.5
<i>Exiguobacterium</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	16.6	0	0	0
<i>Clostridium</i>	0	0	0	0	0	0	0	9	7	0	0	0	0
<i>Chryseolinea</i>	1.2	0	0	0	0	0	0	0.7	0.6	0.1	3.2	5.3	3.8
<i>Vitreoscilla</i>	0	0	0	0	0	0	0	7.8	6.1	0	0	0.1	0.1
<i>Sphingobium</i>	0.1	0.1	0	0	0	0	0.2	1.9	1.5	6.3	1.1	0.8	0.8
<i>Taibaiella</i>	0	0	0	0	0	0	12.4	0	0	0	0	0	0.1
<i>Lewinella</i>	0	0	0	0	0	0	0	5.8	4.6	0.1	0.6	0.7	0.9
<i>Stenotrophomonas</i>	0	0.4	0.7	1.9	1.6	2.7	0.1	0.9	0.7	1.5	0	0	0
<i>Terrimonas</i>	1	0	0	0	0	0	0	2.5	1.9	1.3	1	1.3	1.2
<i>Actinomadura</i>	0.4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	4.7	2.9	1.7
<i>Aciditerrimonas</i>	2.5	0	0	0	0	0	0	0.2	0.1	0.1	1.9	2.5	2
<i>Bradyrhizobium</i>	3.1	0	0	0	0	0	0	0.4	0.3	0.1	1.6	1.8	1.6
<i>Sphingopyxis</i>	0	0	0	0	0	0	0	1.8	1.4	5.2	0.1	0.1	0.1
<i>Hyphomicrobium</i>	4.1	0	0	0	0	0	0	0.1	0	0.2	1.4	1.3	1.2
<i>Herpetosiphon</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	7.8	0.2	0.1	0.1
<i>Nocardioides</i>	1.8	0	0	0	0.3	0	0	0	0	0	2.4	1.6	1.7
<i>Gluconacetobacter</i>	0.1	1.4	0.1	0.6	4.2	0	0	0	0	0	0.1	0.2	0.3
<i>Candidatus solibacter</i>	0.7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1.7	2.1	2.3
<i>Sphingomonas</i>	3	0	0	0	0	0	0	0.1	0.1	0.1	1	1.1	1.4
<i>Mesorhizobium</i>	2.2	0	0	0	0	0	0	0.1	0.1	0.1	1.7	1.4	1.1
<i>Luteimonas</i>	0	0	0.3	0	0	2.3	3.6	0	0	0	0	0	0
<i>Solirubrobacter</i>	3.1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1.1	1.2
<i>Paenibacillus</i>	0.1	0	0	0	0	0	0	3.2	2.5	0.1	0	0	0
<i>Castellaniella</i>	0	1	0.8	1.6	1.6	0.3	0.4	0	0	0	0	0	0
<i>Pedomicrobium</i>	4.3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.3	0.4	0.5
<i>Siansivirga</i>	0	1.1	3.3	0.9	0.2	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Brevundimonas</i>	0	0.1	0.8	0	0	0	0.4	0.5	0.4	3.1	0	0	0
<i>Actinoallomurus</i>	0.4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1.8	1.5	1.1
<i>Steroidobacter</i>	3.9	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.2	0.3	0.4
<i>Rhizobium</i>	0.5	0	0	0	0.1	0.1	0	1.1	0.9	0.4	0.7	0.4	0.5
<i>Novosphingobium</i>	0	0	0.1	0.1	0.1	0	0	0.9	0.7	2.3	0.1	0.2	0.2
<i>Rubrivivax</i>	0.2	0	0	0	0	0	0	0.8	0.6	0.3	0.4	0.9	1.3
<i>Fluviicola</i>	0	0	0	0.1	0	0.8	0	1.6	1.3	0.3	0	0	0
<i>Gemmatimonas</i>	0.5	0	0	0	0	0	0	1.5	1.2	0.1	0.2	0.2	0.5
<i>Ilumatobacter</i>	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.8	0.7	0.6
<i>Woodsholea</i>	0.2	0	0	0	0	0	0	0.9	0.7	0.2	0.3	0.4	1.5
Remaining taxa (265)	38.6	5	5.7	7.5	4.2	1.6	5	21.2	16.6	19.5	36.1	37.8	41.1

Figura 8. Análisis de la composición taxonómica del consorcio aportado por el laboratorio autor Nicolas Rodriguez. Resultados no publicados.

A partir de los resultados anteriores se procedió a la obtención de nuevo consorcio, adaptado desde sus inicios a una alimentación sin fuentes de Nitrógeno y así favorecer a este grupo de fijadores de Nitrógeno. En la **segunda etapa**, se evaluaron los consorcios de S, D y Z a lo largo de tres recambios, utilizando el medio sin nitrógeno (sección 6.2.4), con AGVs como fuente de carbono, las proporciones y los nutrientes usados para este medio se formularon a partir de otros medios usados en literatura, asegurándose de incorporar los precursores para la FBN (Mo, Fe y Va). Se monitoreo las variables: DO, nitrógeno total, consumo de AGVs y conteos de UFC. Dado que en este medio se

promueve la formación de agregados celulares, fue necesaria la agitación magnética a 600 rpm para asegurar mezcla completa. La fig 9 resume estos resultados, proporcionando una visión integral de la fijación de nitrógeno de los consorcios utilizando un medio sin fuente de nitrógeno. En anexo, tabla 2, se observan los resultados de los cálculos de rendimiento y tasas de crecimiento. Los resultados revelaron diferencias significativas en la eficiencia y estabilidad de cada consorcio, destacando la importancia de la diversidad microbiana.

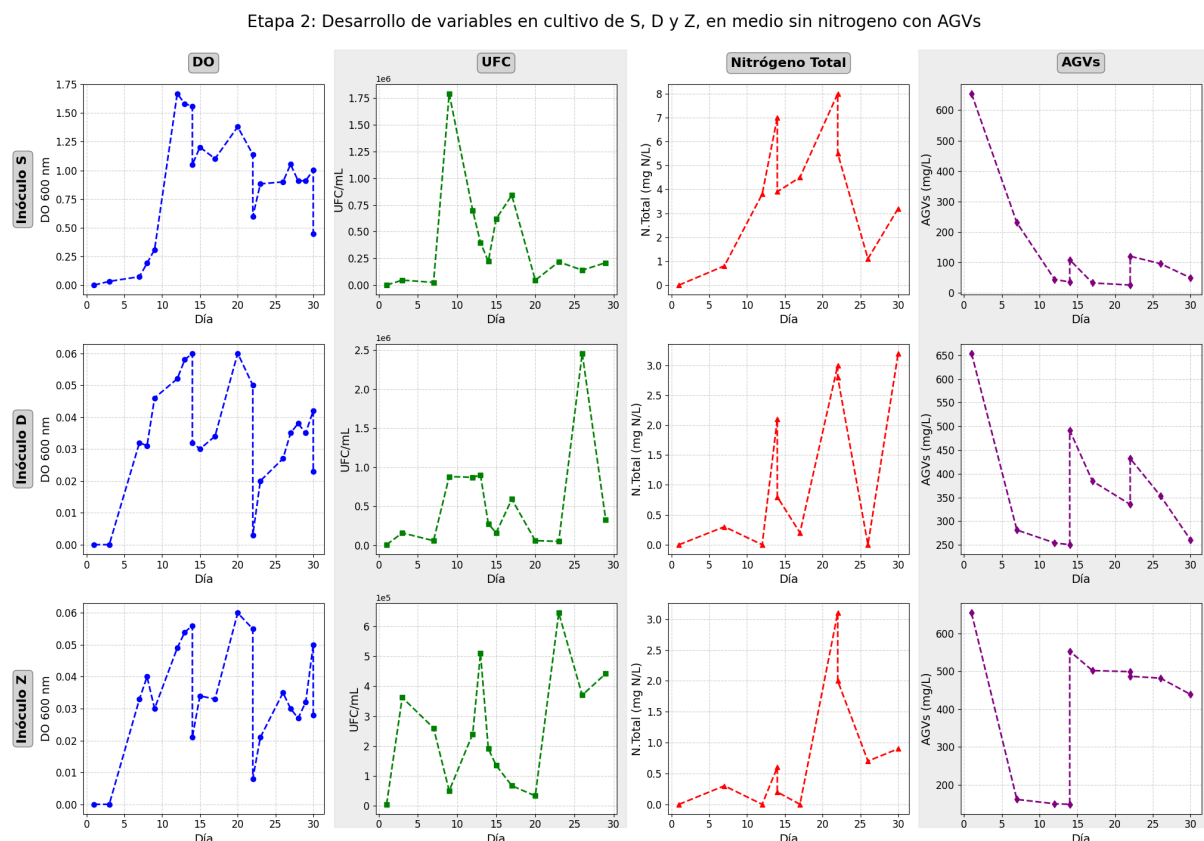


Figura 9. Etapa 2: Desarrollo de los inóculos S, D y Z, en medio sin nitrógeno con fuente de carbono AGVs. De arriba a abajo se presentan los inóculos utilizados: Consorcios **S** (muestra de suelo) y **D** (muestra de suelo de varios ambientes), y la cepa pura **Z** (*Azotobacter*). Cada columna representa una variable diferente: **(DO)** Densidad Óptica a 600 nm , **(UFC)** Unidades Formadoras de Colonias por mililitro, **Nitrógeno Total** en mg N/L y **(AGVs)** Ácidos Grasos Volátiles en mg/L.

Los resultados obtenidos durante el enriquecimiento secuencial en medio libre de nitrógeno indican una activación progresiva del metabolismo fijador dentro de los consorcios microbianos derivados del suelo. En el día 1, se observó una tasa elevada de crecimiento

microbiano (0.674 1/día) en el consorcio Z, aunque con baja producción de nitrógeno (0.075 mg) y una densidad celular limitada (0.6 UFC), lo que sugiere la presencia de microorganismos heterótrofos no fijadores que posiblemente utilizaron residuos nitrogenados remanentes del suelo o del inóculo. Hacia el día 14, se evidenció un aumento sustancial tanto en la producción de nitrógeno (0.175 mg) como en la biomasa (2.9 UFC), a pesar de una reducción en la tasa de crecimiento (0.062 1/día). Este patrón es característico de la transición metabólica hacia la fijación biológica de nitrógeno, donde ciertas especies diazótrofes comienzan a dominar funcionalmente dentro del consorcio. La diversidad funcional y estructural de estos microbiomas puede incluir géneros como *Azotobacter*, *Beijerinckia*, *Herbaspirillum*, *Bradyrhizobium*, o *Paenibacillus*, entre otros, que son capaces de inducir la expresión de la nitrogenasa bajo condiciones estrictamente limitantes en nitrógeno combinado (Dixon & Kahn, 2004; Raymond et al., 2004). Además, la necesidad de condiciones microaerófilas para la protección de la nitrogenasa, junto con la competencia entre especies por el carbono disponible, explican la reducción en la tasa de crecimiento mientras se incrementa la eficiencia de fijación (rendimiento de 0.105 mg N/mg AGVs). Estos resultados confirman la utilidad del enfoque por lotes secuenciales en medio libre de nitrógeno para seleccionar consorcios funcionales con potencial fijador, representando una estrategia efectiva para el aislamiento futuro o formulación de bioinoculantes.

Sin embargo los resultados con el crecimiento también revelaron que el tiempo de retención del nutriente fue poco, lo que impidió una mejor adaptación.

Los resultados obtenidos evidenciaron que los consorcios microbianos alcanzaron mayores niveles de crecimiento y producción de nitrógeno en comparación con la cepa pura de *Azotobacter*, lo cual subraya la importancia de las interacciones sinérgicas en comunidades microbianas complejas para optimizar la asimilación de recursos en ambientes restrictivos (López et al., 2023). Además, el empleo de AGVs —con una composición análoga a la obtenida de estiércol de cerdo— demostró su eficacia como fuente de carbono, ofreciendo una alternativa respecto a sustratos tradicionales como la glucosa, alineándose con los principios de la economía circular. Sin embargo, la variabilidad observada en los perfiles de crecimiento impide designar un “consorcio óptimo” de manera concluyente, lo que abre

la posibilidad de ensayos en sistemas de cultivo con microalgas para evaluar la eficacia de estos consorcios para el cultivo de microalgas en este caso *C. sorokiniana*.

7.2. Evaluación del crecimiento de *C. sorokiniana* en diferentes medios.

En la **configuración 1**, inoculado con un promedio de 42 cell/ μ L, en 3 mL, se evaluó el desarrollo de *C. sorokiniana* durante tres días, comparando el medio BBM con tres efluentes (S, NR y D) esterilizados en autoclave. En la fig 9 se presentan las curvas de crecimiento de los cultivos.

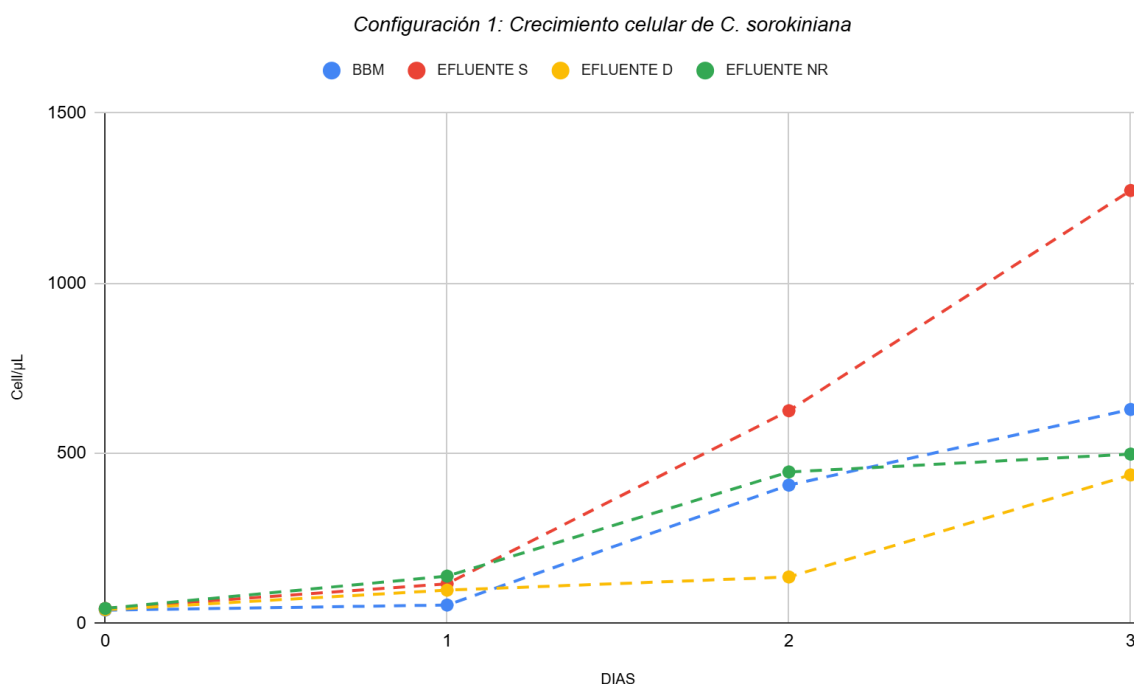


Figura 9. Configuración 1: Crecimiento celular de *C. sorokiniana*. Utilizando el medio control **BBM**, los efluentes de los consorcios **S** (muestra de suelo), **D** (muestra de suelo de varios ambientes) y **NR** (autoensamblado con trazas de N y AGVs).

El seguimiento del conteo celular reveló que no hubo indicios de inhibición o presencia de compuestos tóxicos que impidieran el crecimiento. El efluente S promovió un mayor crecimiento, superando tanto al control como a los otros dos efluentes, con 1272 cell/ μ L al día 3, con una tasa de crecimiento de $409.58 \frac{1}{d}$. En comparación, el control mostró un crecimiento a una tasa de $196.67 \frac{1}{d}$, mientras que los efluentes NR y D registraron menores concentraciones celulares, con 500 y 450 cell/ μ L, respectivamente, reflejadas en

tasas de crecimiento de 151.25 y 132.08 $\frac{1}{d}$. Estos hallazgos indican que los efluentes derivados de los consorcios bacterianos pueden proporcionar nutrientes esenciales durante la fase de crecimiento inicial de *C. sorokiniana*, incluso mejor que el medio estándar y abre la posibilidad de profundizar en la optimización de fuentes nutritivas alternativas para la producción de biomasa microalga.

Para la **configuración 2**, se utilizó inóculo de 1 mL, alimentándose con el medio BBM y los efluentes de los cultivos de Z, D y S. Evaluándose el crecimiento mediante conteo celular y la dinámica de nitrógeno (N-NH_4^+ y N-NO_3^-) durante nueve días de cultivo, representados en la fig 10. De manera complementaria se muestra el boxplot, comparando el crecimiento como recuento de células (fig 11. A) y los rendimiento (fig 11. B) en donde se incluyen las diferencias significativas identificadas mediante letras indicadoras. Además, en el Anexo (Tabla 2) se muestran las tasas de crecimiento y rendimientos.

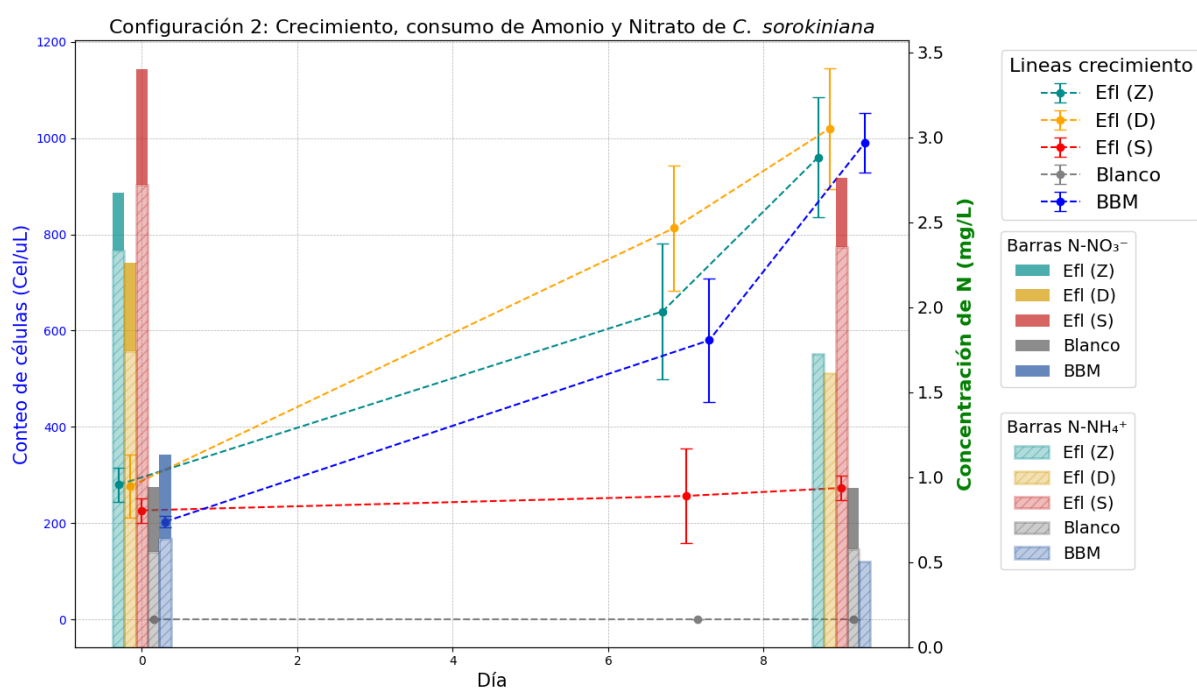


Figura 10. Configuración 2: Crecimiento celular y consumo de amonio y nitrato de *C. sorokiniana*. Se presentan las líneas de crecimiento, junto con las barras apiladas de N-NO_3^- y N-NH_4^+ . Utilizando los efluentes de la cepa pura **Z** (*Azotobacter*) barras cian, los consorcios **S** (muestra de suelo) barras rojas y **D** (muestra de suelo de varios ambientes) barras amarillas, el medio control **BBM** barras azules y el **Blanco** sin inocular barras grises.

Análisis de Conteo Celular de *C. sorokiniana*

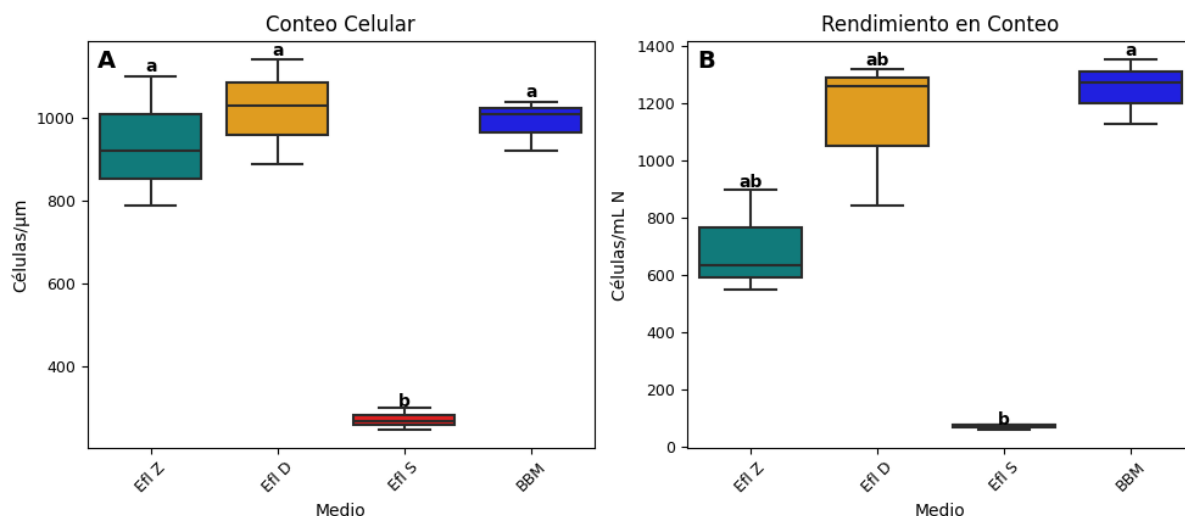


Figura 11. Diagrama de caja y bigotes de la configuración 2 de *C. sorokiniana*. **A)** Análisis ANOVA-Tukey, realizado con los datos de conteo celular. **B)** Análisis Kruskal-Dunn, realizado con los datos de rendimiento. Letras diferentes muestran diferencias estadísticamente significativas (ANOVA-Tukey y Kruskal-Dunn $p < 0.05$).

El cultivo en el medio control BBM alcanzó 1000 células/ μL de *C. sorokiniana* al día 10, con una tasa de crecimiento de 87.41 cell/ $\mu\text{L}/\text{día}$ y un rendimiento de biomasa de 1.250 células/mg N, sirviendo como referencia para evaluar el desempeño de los tratamientos con efluentes bacterianos. Los tratamientos con los efluentes D y Z no mostraron diferencias significativas respecto al control, lo que sugiere que, bajo ciertas condiciones, estos efluentes pueden proporcionar un ambiente de cultivo comparable al medio sintético. Esto indica su potencial como alternativa viable para el cultivo de microalgas.

Por otro lado, el tratamiento con efluente S mostró diferencias significativas con todos los tratamientos según la prueba de Tukey ($p = 0.0003$) para el crecimiento, mientras que el rendimiento presentó diferencias significativas con el control según la prueba de Dunn ($p = 0.0303$), disminuyendo a 5.19 células/ $\mu\text{L}/\text{día}$ y su rendimiento a 73.3 células/mg N, representando una reducción del 94.1% en comparación con el control. Como el pH se ajustó a 7.2 en todos los casos, este no parece ser el motivo, no obstante, es posible que haya interactuado con la composición química específica del medio S, que pudo haber limitado la disponibilidad de nutrientes o alterado la estabilidad de compuestos esenciales

(Tong et al., 2023). Otra posible explicación es una modificación en la estructura del consorcio bacteriano, favoreciendo la producción de compuestos inhibidores que impactaron el metabolismo de *C. sorokiniana*.

Estos resultados subrayan la necesidad de considerar no solo la presencia de nutrientes en los medios de cultivo, sino también la interacción de los microorganismos en los consorcios y la posible producción de subproductos que pueden influir positiva o negativamente en el crecimiento de las microalgas. La evaluación de estos factores es clave para optimizar el uso de efluentes bacterianos como fuentes alternativas para el crecimiento de microalgas, favoreciendo su aplicación en bioprocesos sustentables y contribuyendo al desarrollo de estrategias más eficientes para la producción de biomasa microalgal.

En la **configuración 3**, se empleó un inóculo de 20 mL y se alimentó con los efluentes de los cultivos de NR, S, Z y D, que fueron enriquecidos para aproximarlos a la composición del medio BBM, permitiendo una comparación más precisa en relación con la fuente de nitrógeno. Dado que en la configuración anterior se observó un consumo completo de nitrato, la presente configuración se centró en medir el nitrógeno en forma de nitrato, también se midió el crecimiento de *C. sorokiniana* a una longitud de onda de 690 nm durante un periodo de seis días, estas medidas se representan en la fig 12. De manera complementaria se muestra el diagrama de caja y bigotes, comparando los crecimiento (fig 13. A) y los rendimiento (fig 13. B), incluyendo las diferencias significativas identificadas mediante letras indicadoras. Además, en el Anexo (Tabla 3) se muestran las tasas de crecimiento y rendimientos, proporcionando un análisis completo del proceso en esta configuración.

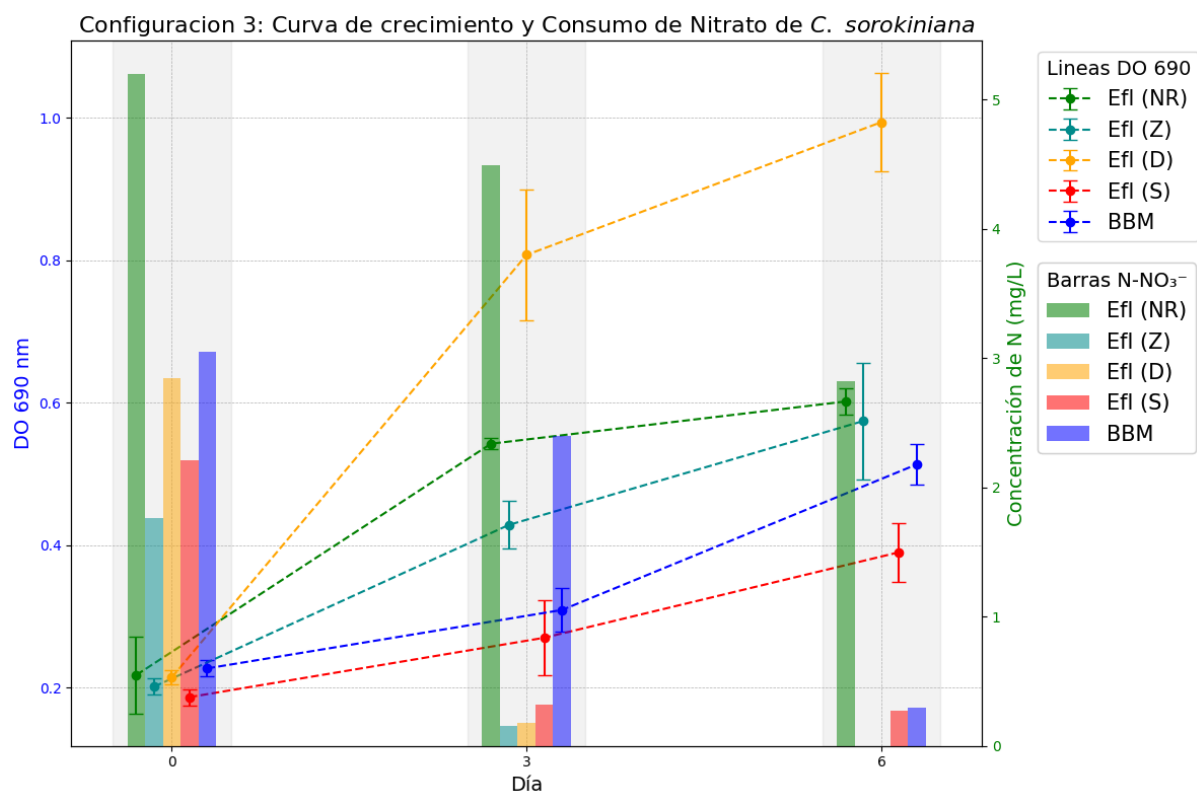


Figura 12. Configuración 3: Evaluación de crecimiento DO 690 nm y consumo de nitrato de *C. sorokiniana*. Se presentan las líneas de crecimiento, junto con las barras de N-NO₃⁻. Utilizando el medio control medio control **BBM** barras azules y los efluentes de la cepa pura **Z** (*Azotobacter*) barras cian, los consorcios **NR** (autoensamblado con trazas de N y AGVs) barras verdes, **S** (muestra de suelo) barras rojas y **D** (muestra de suelo de varios ambientes) barras amarillas.

Análisis de Densidad Óptica (DO) de *C. sorokiniana*

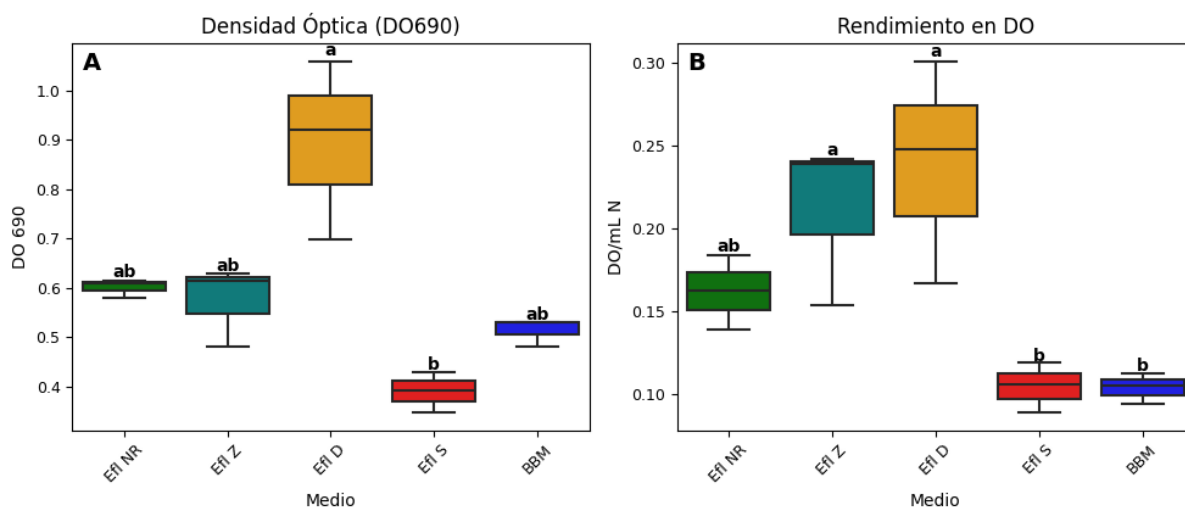


Figura 13. Diagrama de caja y bigotes de la configuración 3 de *C. sorokiniana*. **A)** Análisis Kruskal-Dunn realizado con los datos de densidad óptica final. **B)** Análisis ANOVA-Tukey realizado con los datos de rendimiento. Letras diferentes muestran diferencias estadísticamente significativas (ANOVA-Tukey Kruskal-Dunn $p < 0.05$).

Los datos muestran que el tratamiento D alcanzó la mayor densidad óptica con un valor promedio de 1.10 ± 0.20 , seguido por Z (0.92 ± 0.15) y R (0.85 ± 0.12). En contraste, los tratamientos S y el control mostraron los valores más bajos, con 0.47 ± 0.09 y 0.48 ± 0.07 , respectivamente.

El análisis estadístico reveló que, a excepción del tratamiento S, no se observaron diferencias significativas en el crecimiento en comparación con el control. Sin embargo, el análisis de varianza (ANOVA) mostró diferencias significativas en el rendimiento ($p = 0.0055$), con los efluentes Z y D presentando rendimientos superiores al control (Tukey, $p < 0.05$). Al suplementar los efluentes y aumentar la cantidad de inóculo, los tratamientos NR, Z y D lograron tasas de crecimiento de 0.062 ± 0.015 , 0.064 ± 0.009 y 0.113 ± 0.032 1/d, respectivamente, superando el valor del control (0.048 ± 0.004 1/d) en al menos un 20%. En contraste, el tratamiento S, que había mostrado el menor desempeño en la configuración anterior, obtuvo valores de crecimiento de 0.039 ± 0.014 1/d y rendimiento de 0.105 ± 0.015 DO/mL AGVs, sin diferencias significativas con el control. Esto sugiere que la suplementación mejoró las condiciones generales del medio.

Los resultados sugieren que la suplementación optimizó las condiciones del medio, permitiendo un crecimiento más uniforme y mejorando el rendimiento de los efluentes enriquecidos en comparación con el medio control. Esto destaca el potencial del nitrógeno fijado biológicamente en los efluentes como una alternativa viable para aplicaciones biotecnológicas con microalgas. Estos hallazgos respaldan futuras investigaciones orientadas a optimizar la composición de los efluentes y maximizar su eficiencia en bioprocesos sostenibles. Se recomienda continuar explorando estrategias de optimización en la formulación de medios, enfocándose en mejorar la fijación de nitrógeno y su integración en cultivos de microalgas antes de su escalado industrial.

7.3. Análisis de costos solo medio.

El costo de los medios de cultivo es un factor determinante para la viabilidad de cualquier proceso biotecnológico. En este análisis se comparan los costos del medio estándar BBM, con los efluentes derivados del uso de los medios BBMM y el medio sin nitrógeno para bacterias fijadoras de nitrógeno, con el fin de evaluar su competitividad económica y recomendar estrategias para mejorar su viabilidad. Los costos obtenidos para cada medio de cultivo se muestran en la tabla 1.

Tabla 1. Comparación de Costos por Litro de Medio. *Para detalles consultar anexo

Medio de Cultivo	Costo (COP/L)
BBMM	1432,82
BBM	376,15
Medio sin nitrógeno	830,27

Análisis de Costos del Sistema Mixto: Consorcios Fijadores de Nitrógeno y Cultivo de Algas

Este documento detalla el paso a paso del análisis económico realizado para un sistema mixto que combina la producción de consorcios bacterianos fijadores de nitrógeno con el cultivo de microalgas. El objetivo es evaluar la viabilidad del sistema considerando el uso de medios sin fuentes externas de nitrógeno ni carbono, y el aprovechamiento comercial de la biomasa bacteriana como biofertilizante.

Paso a paso del análisis económico

Paso del análisis	Fórmula o ecuación aplicada	Valor numérico	Fuente o justificación del dato
1. Volumen total de cultivo (L)	Definido por el usuario	100	Escala de simulación para producción en laboratorio o piloto
2. Costo del medio por litro (COP)	Valor reportado en tesis (medio sin N/C)	830.27	Tabla de costos medios en tesis (medio modificado sin fuentes de N ni C)

3. Costo total de producción (COP)	= Volumen * Costo por litro	83027	Costo proyectado para 100 L de producción en condiciones experimentales
4. Porcentaje usado para algas	Supuesto para análisis funcional mixto	50%	División funcional del cultivo para dos propósitos
5. Volumen para algas (L)	= Volumen total * 0.5	50	Se destina la mitad a microalgas que aprovechan el N fijado
6. N fijado por litro (mg)	Valor promedio experimental observado	4.5	Promedio de los valores reportados en datos experimentales
7. N total fijado (mg)	= Volumen algas * N por litro	225	Cantidad total de nitrógeno disponible para algas
8. Porcentaje vendido como biofertilizante	Supuesto: el resto se destina a venta	50%	Resto del cultivo aprovechado para generar ingresos
9. Volumen vendido (L)	= Volumen total * 0.5	50	Volumen restante usado como inóculo o biofertilizante
10. Precio de venta (COP/L)	Precio estimado del mercado local colombiano	6000	Basado en precios de referencia de productos similares (Azotobacter líquido)
11. Ingreso por ventas (COP)	= Precio por L * Volumen vendido	300000	Estimación del ingreso bruto por ventas
12. Ganancia neta (COP)	= Ingreso - Costo total	216973	Resultado económico neto del sistema mixto

Este análisis demuestra que el sistema mixto no solo permite el aprovechamiento del nitrógeno fijado por bacterias en el cultivo de microalgas, sino que también resulta rentable cuando se destina parte del cultivo a la venta como biofertilizante. Con un costo total de producción de 83,027 COP para 100 litros y una ganancia proyectada de 216,973 COP, el modelo es viable en contextos de agricultura sostenible y producción circular.

La optimización de los consorcios mediante ingeniería microbiana y ajustes en el medio de cultivo puede incrementar significativamente la fijación de nitrógeno, mejorando la eficiencia y rentabilidad del sistema. Para ello, se propone la selección dirigida de comunidades microbianas con alta actividad nitrogenasa, junto con la optimización de concentraciones de sales esenciales como vanadio, molibdeno y hierro (Kuypers et al., 2018). Asimismo, evaluar el impacto de distintas cantidades de AGVs provenientes de residuos agroindustriales como fuente de carbono y adaptar las condiciones de cultivo a través de estrategias como la optimización del tiempo de cultivo, mejoras en la aireación y la implementación de modos de operación semicontinuos en lugar de por lotes, permitiría potenciar el proceso y consolidar su viabilidad económica y productiva.

8. CONCLUSIONES.

Este estudio demostró que la disponibilidad de nitrógeno en el medio tiene un impacto directo en el crecimiento bacteriano y en la activación de la FBN. En el medio BBMM con 10 mg N/L (como NH_4Cl), los consorcios bacterianos mostraron un crecimiento inicial más rápido, alcanzando una DO600 promedio de 0.5 y un máximo de 2.2 en la réplica 2, en comparación con *Azotobacter vinelandii*, que solo alcanzó DO600 de 0.2. Durante esta etapa, se observó una disminución progresiva del N.Total en el cultivo, lo que indica un consumo de nitrógeno para la síntesis de biomasa. Al reducir la fuente de nitrógeno a la mitad, el crecimiento disminuyó proporcionalmente, pero se registró un aumento transitorio del N.Total hasta 27 mg N/L, sugiriendo la activación de la enzima nitrogenasa. Pese a ello, al quitar el suplemento de N, el crecimiento se redujo drásticamente a DO600 de 0.05, y N.Total por debajo de 1 mg/L, evidenciando un cuello de botella nutricional. Estos resultados indican que el uso de nitrógeno inicial debe ser cuidadosamente estudiado, dado que concentraciones elevadas pueden inhibir la enzima nitrogenasa. Se recomienda estudiar rangos de concentración entre 5 y 10 mg N/L, para explorar su aplicación de manera intermitente para lograr un equilibrio entre suplementación y limitación de nitrógeno, maximizando así la fijación biológica.

El medio sin nitrógeno, formulado con AGVs como fuente de carbono, demostró ser funcional al permitir el crecimiento microbiano, utilizando exclusivamente el nitrógeno atmosférico suministrado por aireación a 0.3 L/min. Además, logró una asimilación inicial

de hasta el 96 % de los AGVs, en el consorcio S, demostrando su viabilidad como sustrato alternativo, especialmente cuando se derivan de residuos agroindustriales como el estiércol de cerdo. En estas condiciones, las bacterias formaron agrupaciones, siendo necesario aplicar agitación magnética a 600 rpm para garantizar un entorno homogéneo y evitar la sedimentación celular, buscando mayor disponibilidad de nutrientes y actividad metabólica.

El análisis del comportamiento de los distintos inóculos resaltó la importancia del origen y la preadaptación en la eficiencia de la FBN. El consorcio S, tomado directamente de suelo y cultivado en un medio sin nitrógeno desde el inicio, presentó el mayor rendimiento de FBN respecto al consumo de AGVs, siendo 56 % superior al de *Azotobacter*, alcanzando una concentración máxima de 8 mg N/L. Lo que sugiere que la exposición directa a entornos sin nitrógeno favorece la adaptación de las comunidades fijadoras. En contraste, el consorcio D, derivado de una mezcla de suelos y preadaptado en un medio con trazas de nitrógeno, mostró un crecimiento y medición de N.Total menor (DO600: 0.05 y 3.1 mg N/L), comportamiento similar al del inóculo NR en la etapa 1. Este último, al ser condicionado inicialmente al medio con nitrógeno y posteriormente al ser alimentado sin este nutriente, experimentó un colapso total en crecimiento (DO600: 0.5 a 0.05) y fijación (N.Total < 1 mg N/L). La preadaptación de los consorcios a un medio sin nitrógeno, como en el caso de S, favorece la fijación de nitrógeno, mientras que inóculos con antecedentes de suplementación nitrogenada pueden presentar una reducción en su capacidad fijadora. Estos hallazgos resaltan que la preadaptación a un medio sin nitrógeno, como en el caso del consorcio S, favorece la activación temprana de la nitrogenasa, mientras que inóculos con antecedentes de suplementación nitrogenada pueden presentar una reducción en su capacidad fijadora.

Dado que la fuente de inóculo y su historial de adaptación son determinantes en la fijación de nitrógeno, se recomienda emplear inóculos provenientes de suelos con baja o nula intervención nitrogenada y aplicar estrategias de preadaptación en condiciones sin nitrógeno antes de su uso en sistemas de fijación biológica. Adicionalmente, se sugiere utilizar tiempos de retención superiores a 7 días para mejorar la estabilidad del cultivo y permitir una mejor transición metabólica hacia la fijación de nitrógeno.

El efluente proveniente de los cultivos inoculados con CFN se estableció como una fuente efectiva de nitrógeno para el cultivo de *Chlorella sorokiniana* demostrando su viabilidad frente al medio convencional BBM. Los efluentes, provenientes de *Azotobacter* y los consorcios S, D y NR aportaron bionitrógeno, principalmente en forma de nitratos, permitiendo una asimilación de hasta el 100 % de esta fuente, demostrando su capacidad para sostener el crecimiento en diversas condiciones. En términos de rendimiento, los efluentes provenientes de los consorcios D y Z en la configuración final lograron una eficiencia de 0.239 y 0.212 DO690/mg N, superando en 130 % y 104 % al BBM (0.104 DO690/mg N). Esto evidencia que el efluente puede igualar e incluso superar al BBM, aun cuando presenta concentraciones iniciales de nitrógeno inferiores. Además, representa una ventaja tanto económica como ambiental al sostener el crecimiento de la microalga sin necesidad de fuentes sintéticas de nitrógeno.

Los efluentes destacan por su sostenibilidad y potencial económico frente al BBM, que usa nitrógeno químico, cuya producción emite gases como N_2O . En contraste, el efluente utiliza NFB con AGVs de residuos como estiércol de cerdo, como fuente de carbono. Aunque el costo actual de preparación del efluente (830 COP/L) es superior al del BBM (376 COP/L), optimizar la fijación de nitrógeno hasta niveles de 40-100 mg N/L, como se ha reportado en estudios previos (Rodríguez, 2023; Arroyo, 2017), podría reducir los costos finales entre un 2 % y un 10 %, haciéndolo competitivo a escala industrial. Además, su versatilidad para sostener el crecimiento microalgal sin enriquecimiento adicional refuerza su potencial en biorrefinerías. Esta estrategia no solo optimiza el uso de nutrientes, transformando subproductos bacterianos en un insumo valioso, sino que también mitiga el impacto ambiental de los fertilizantes tradicionales, posicionando al efluente como una alternativa innovadora y ecológica para la producción de biomasa, promoviendo sistemas de producción más sostenibles y alineados con la transformación azul.

9. PERSPECTIVAS.

Las futuras investigaciones deben enfocarse en la caracterización detallada de los efluentes, incluyendo la composición del nitrógeno (NO_3^- , NO_2^- , NH_4^+), concentración de carbono orgánico total (TOC), relación C/N. Además, se recomienda realizar estudios de espectrometría de masas y cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) para determinar

la composición exacta de los efluentes y su impacto en el metabolismo algal, para identificar y mitigar factores inhibidores.

El trabajo realizado y las necesidades identificadas en este estudio resaltan la importancia de explorar métodos innovadores que permitan mejorar la producción de nitrógeno y otros metabolitos de interés. Entre estas estrategias, la ingeniería de consorcios microbianos surge como una alternativa prometedora para optimizar la interacción entre especies, promoviendo procesos biotecnológicos más sostenibles. Se sugiere el uso de secuenciación metagenómica para identificar los principales taxones asociados a los consorcios de mayor rendimiento y evaluar su estabilidad en cultivos prolongados. Además, se recomienda aplicar técnicas de evolución adaptativa en biorreactores con ciclos de recambio prolongados (≥ 10 días), permitiendo la selección de cepas con mayor capacidad de fijación y sinergia con las microalgas.

Para mejorar la producción de nitrógeno, se propone implementar sistemas de cultivo semicontinuo con tiempos de retención de 10-14 días, en lugar de los 7 días utilizados en este estudio. También, se recomienda implementar estrategias de monitoreo en tiempo real de parámetros críticos como pH, concentración de oxígeno disuelto, potencial de óxido-reducción (ORP) y turbidez mediante sensores en línea. Esto representaría un enfoque integral que combine la optimización de nutrientes con el control de condiciones operativas en biorreactores para mejorar la estabilidad y productividad de sistemas microbianos-algales en biotecnología.

Este trabajo se plantea en investigaciones futuras a optimizar sistemas microbianos-algales sostenibles, en sistemas compartimentados por membranas semipermeables, permitiendo un intercambio selectivo de metabolitos como nitrógeno fijado, oxígeno y compuestos orgánicos sin transferencia de microorganismos. Este enfoque puede implementarse en biorreactores compartimentados con membranas de ultrafiltración (0.01 - 0.1 μm), permitiendo el paso de iones y nutrientes mientras retienen las células. Se recomienda evaluar configuraciones como membranas de fibra hueca o módulos de difusión lateral, analizando su impacto en la asimilación de nitrógeno, tasa de crecimiento específica (μ) y producción de biomasa seca, comparándolo con cultivos convencionales para determinar su viabilidad y eficiencia.

10. REFERENCIAS.

- Aasfar, A., Bargaz, A., Yaakoubi, K., Hilali, A., Bennis, I., Zeroual, Y., & Meftah Kadmiri, I. (2021). Nitrogen Fixing Azotobacter Species as Potential Soil Biological Enhancers for Crop Nutrition and Yield Stability. *Frontiers in Microbiology*, 12. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.628379>
- Abalde, J., Cid, Á., Fidalgo, P., Torres, E., & Herrero, C. (1995). *Microalgas: Cultivo y aplicaciones*. Universidade da Coruña, Servizo de Publicacións. <https://ruc.udc.es/dspace/handle/2183/25013>
- Aburai, N., Tsukagoshi, T., Sekiguchi, S., Arakawa, H., Imamura, Y., & Abe, K. (2023). Mutual supply of carbon and nitrogen sources in the co-culture of aerial microalgae and nitrogen-fixing bacteria. *Algal Research*, 70, 103001. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2023.103001>
- Agroactivo. (s. f.). FIJADOR DE NITROGENO AZOBAC (Azotobacter chroococcum). *Agroactivo*. Recuperado 27 de mayo de 2024, de <https://agroactivocol.com/producto/nutricion-vegetal/fijador-de-nitrogeno-azobac/>
- Arroyo, A. F. A. (2017). *PRODUCCIÓN DE AMONIO Y BIOMASA ACTIVA A PARTIR DE CONSORCIOS MICROBIANOS PROVENIENTES DE SISTEMAS DE TRATAMIENTO DE AGUAS RESIDUALES DOMESTICAS*.
- Cai, J. (2021). *Seaweeds and microalgae: An overview for unlocking their potential in global aquaculture development*. FAO. <https://doi.org/10.4060/cb5670en>
- Cai, Y., Zhai, L., Fang, X., Wu, K., Liu, Y., Cui, X., Wang, Y., Yu, Z., Ruan, R., Liu, T., & Zhang, Q. (2022). Effects of C/N ratio on the growth and protein accumulation of heterotrophic Chlorella in broken rice hydrolysate. *Biotechnology for Biofuels and Bioproducts*, 15(1). <https://doi.org/10.1186/s13068-022-02204-z>
- Cherlinka, V. (2022, enero 12). *Fijación Biológica De Nitrógeno: Beneficios De Su Uso*. <https://eos.com/es/blog/fijacion-biologica-de-nitrogeno/>
- Cooper, M. B., & Smith, A. G. (2015). Exploring mutualistic interactions between microalgae

- and bacteria in the omics age. *Current Opinion in Plant Biology*, 26, 147-153.
<https://doi.org/10.1016/j.pbi.2015.07.003>
- Curi, M. A., Medina, E. G., & Jiménez, V. H. (2020). Azotobacter y Rhizobium como biofertilizantes naturales en semillas y plantas de frijol caupí. *Avances*, 22(2).
<https://www.redalyc.org/journal/6378/637869116006/html/>
- DANE. (2024). *Insumos y factores de la producción agropecuaria (SIPSA_I) Enero de 2024* (Boletín 139). DANE.
<https://www.dane.gov.co/files/operaciones/SIPSA/bol-SIPSAInsumos-enero2024.pdf>
- Dixon, R., & Kahn, D. (2004). *Genetic regulation of biological nitrogen fixation*. 2(8), 621-631. <https://doi.org/10.1038/nrmicro954>
- Dong, H., Liu, W., Zhang, H., Wang, Z., Feng, F., Zhou, L., Duan, H., Xu, T., Li, X., & Ma, J. (2023). Enhanced biomass production and wastewater treatment in attached co-culture of *Chlorella pyrenoidosa* with nitrogen-fixing bacteria *Azotobacter beijerinckii*. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 46(5), 707-716.
<https://doi.org/10.1007/s00449-023-02855-8>
- FAO. (2022). *El estado mundial de la pesca y la acuicultura 2022: Hacia la transformación azul*. FAO. <https://doi.org/10.4060/cc0461es>
- FAO. (2024). *El estado mundial de la pesca y la acuicultura 2024: La transformación azul en acción*. FAO ; <https://openknowledge.fao.org/handle/20.500.14283/cd0683en>
- Fortune Business Insights. (2019). *Agricultural Inoculants Market Size, Share, Growth, 2032* (FBI101615).
<https://www.fortunebusinessinsights.com/industry-reports/agricultural-inoculants-market-101615>
- Fortune Business Insights. (2022). *Tamaño del mercado de alimentos acuícolas a base de microalgas, participación | Tendencias [2030]* (FBI100494).
<https://www.fortunebusinessinsights.com/industry-reports/microalgae-based-aquafeed-market-100494>

- Gutierrez-Rojas, I., Torres-Geraldo, A. B., & Moreno-Sarmiento, N. (2011). Optimising carbon and nitrogen sources for *Azotobacter chroococcum* growth. *African Journal of Biotechnology*, 10(15), 2951-2958. <https://doi.org/10.5897/AJB10.1484>
- Hernández, O., Ureña, A., & Valerio, W. (2022). Posibles factores que afectan el costo y la rentabilidad de la producción de microalgas: Una revisión bibliográfica. *e-Agronegocios*, 10, 1-21. <https://doi.org/10.18845/ea.v10i1.6657>
- Kuypers, M. M. M., Marchant, H. K., & Kartal, B. (2018). The microbial nitrogen-cycling network. *Nature Reviews Microbiology*, 16(5), 263-276. <https://doi.org/10.1038/nrmicro.2018.9>
- Levens, P., & Sorgeloos, P. (1996). MICRO-ALGAE. En *Manual on the Production and Use of Live Food for Aquaculture* (p. 295). FAO. <https://www.fao.org/3/w3732e/w3732e03.htm#2.%20MICROALGAE>
- López, E. S., Gómez, J. S., & Giraldo, A. O. C. (2023). CONSTRUCCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE CONSORCIOS MICROBIANOS AUTOENSAMBLADOS FIJADORES DE N₂ y CO₂ ATMOSFÉRICO.
- Malagón-Micán, M. L., & Suárez-Chaparro, M. Y. (2020). Influencia de la concentración inicial de *Chlorella vulgaris* y CO₂ en la producción de lípidos. *Revista Lasallista de Investigación*, 17(1), 59-69. <https://doi.org/10.22507/rli.v17n1a5>
- Martindale, W. (2010). Carbon, food and fuel security – will biotechnology solve this irreconcilable trinity? *Biotechnology and Genetic Engineering Reviews*, 27(1), 115-134. <https://doi.org/10.1080/02648725.2010.10648147>
- Mateucci, R. (2018). Efecto de diferentes fuentes de nitrógeno y de fósforo sobre la producción y la composición de la biomasa microalgal de *Arthrospira* (*Spirulina*) *plantensis* LMPA55. <http://ria.utn.edu.ar/xmlui/handle/20.500.12272/3902>
- Mobin, S. M. A., Chowdhury, H., & Alam, F. (2019). Commercially important bioproducts from microalgae and their current applications-A review. *Energy Procedia*, 160. <https://doi.org/10.1016/j.egypro.2019.02.183>

- Mordor Intelligence. (2023). *Tamaño del mercado de biofertilizantes y análisis de acciones—Informe de investigación de la industria—Tendencias de crecimiento*.
<https://www.mordorintelligence.com/es/industry-reports/global-biofertilizers-market-industry>
- Muthusamy, Y., Sengodan, K., Arthanari, M., Kandhasamy, R., & Gobianand, K. (2023). Biofertilizer and Consortium Development: An Updated Review. *Current Agriculture Research Journal*, 11(1), 01-17. <https://doi.org/10.12944/CARJ.11.1.01>
- Nichols, H. W., & Bold, H. C. (1965). *Trichosarcina polymorpha* Gen. Et Sp. Nov. *Journal of Phycology*, 1(1), 34-38. <https://doi.org/10.1111/j.1529-8817.1965.tb04552.x>
- Ortiz Marquez, J. C. F., Arruebarrena Di Palma, A., Ambrosio, R., Inchaurredo, J., & Curatti, L. (2014). Fijación biológica del nitrógeno como estrategia alternativa a la producción industrial de fertilizantes nitrogenados. En *Tópicos selectos en biodiversidad y biotecnología*. Universidad Nacional de Mar del Plata.
<https://ri.conicet.gov.ar/handle/11336/152972>
- Poole, R., & Hill, S. (1997). *Respiratory protection of nitrogenase activity in Azotobacter vinelandii—Roles of the terminal oxidases*. 17(3), 303-317.
<https://doi.org/10.1023/a:1027336712748>
- Raymond, J., Siefert, J. L., & Staples, C. R. (2004). *The natural history of nitrogen fixation*. 21(3), 541-554. <https://doi.org/10.1093/molbev/msh047>
- Richmond, A. (2003). Handbook of Microalgal Culture. En *Handbook of Microalgal Culture* (pp. i-xviii). Blackwell Publishing Ltd. <https://doi.org/10.1002/9780470995280.fmatter>
- Rodríguez, N., Clavijo, J. C., Gutiérrez, C., & Sanabria, J. (2024). *Exploring microbiome engineering to produce nitrogen-fixing biofertilizer using waste-derived carbon sources*.
- Sabra, W., Zeng, A., Lünsdorf, H., & Deckwer, W. (2000). *Effect of oxygen on formation and structure of Azotobacter vinelandii alginate and its role in protecting nitrogenase*. 66(9), 4037-4044. <https://doi.org/10.1128/AEM.66.9.4037-4044>

- Sadoff, H. (1975). *Encystment and germination in Azotobacter vinelandii*. 39(4), 516-539.
<https://doi.org/10.1128/br.39.4.516-539.1975>
- Scott, T. (1975). *Syntrophic relationships between algae and bacteria in a fresh-water stream and in culture* [Dept. of Biological Sciences, Brock University].
https://openlibrary.org/books/OL23408607M/Syntrophic_relationships_between_algae_and_bacteria_in_a_fresh-water_stream_and_in_culture
- Shitanaka, T., Fujioka, H., Khan, M., Kaur, M., Du, Z.-Y., & Khanal, S. K. (2024). Recent advances in microalgal production, harvesting, prediction, optimization, and control strategies. *Bioresource Technology*, 391, 129924.
<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2023.129924>
- Soumare, A., Diedhiou, A. G., Thuita, M., Hafidi, M., Ouhdouch, Y., Gopalakrishnan, S., & Kouisni, L. (2020). Exploiting Biological Nitrogen Fixation: A Route Towards a Sustainable Agriculture. *Plants*, 9(8), Article 8. <https://doi.org/10.3390/plants9081011>
- Theerapisit, S., Rodjaroen, S., & Sintupachee, S. (2023). The Effect of Light Intensity and Nutrient Formula on the Growth of *Chlorella ellipsoidea* in Batch Cultivation. *Trends in Sciences*, 20(12), Article 12. <https://doi.org/10.48048/tis.2023.7009>
- Tong, C. Y., Honda, K., & Derek, C. J. C. (2023). A review on microalgal-bacterial co-culture: The multifaceted role of beneficial bacteria towards enhancement of microalgal metabolite production. *Environmental Research*, 228, 115872.
<https://doi.org/10.1016/j.envres.2023.115872>
- United Nations. (2024). *World Population Prospects 2024: Summary of Results | DESA Publications* (Población UN DESA/POP/2024/TR/NO. 9.; p. 80). United Nations.
<https://desapublications.un.org/publications/world-population-prospects-2024-summary-results>
- Wong, Y., Ho, Y., Ho, K., Leung, H., & Yung, K. (2017). Growth Medium Screening for *Chlorella vulgaris* Growth and Lipid Production. *Journal of Aquaculture & Marine Biology*, 6(1). <https://doi.org/10.15406/jamb.2017.06.00143>

- Xu, P., Shao, S., Qian, J., Li, J., Xu, R., Liu, J., & Zhou, W. (2024). Scale-up of microalgal systems for decarbonization and bioproducts: Challenges and opportunities. *Bioresource Technology*, 130528. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2024.130528>
- Yeh, K.-L., Chang, J.-S., & Chen, W. (2010). Effect of light supply and carbon source on cell growth and cellular composition of a newly isolated microalga *Chlorella vulgaris* ESP-31. *Engineering in Life Sciences*, 10(3), 201-208. <https://doi.org/10.1002/elsc.200900116>
- Zhang, B., Li, W., Guo, Y., Zhang, Z., Shi, W., Cui, F., Lens, P. N. L., & Tay, J. H. (2020). Microalgal-bacterial consortia: From interspecies interactions to biotechnological applications. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 118, 109563. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2019.109563>

Anexos.

Tabla 1. Composición de medios utilizados y sus costos por reactivo.

- El precio unitario se determina de acuerdo con el precio en la base de datos del laboratorio de microbiología de la Universidad del Valle, Cali, Melendez en febrero de 2025.
- La cantidad de productos químicos necesarios para 1 L de medio de microalgas.
- El costo total se calcula en función de la cantidad y el precio unitario de los diversos productos químicos.

Reactivo.	Precio unitario (COP/kg)	Cantidad (g) (b)		
		BBMM (link)	BBM (link)	Sin nitrógeno
NaNO ₃	334000	0,0000	0,2500	0,0000
K ₂ HPO ₄	530000	0,3750	0,0750	0,0000
KH ₂ PO ₄	151000	0,9000	0,1750	2,0000
MgSO ₄ ·7H ₂ O	320000	0,0250	0,0750	0,2000
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	336000	0,0088	0,0088	0,0088
CuSO ₄ ·5H ₂ O	316000	0,0016	0,0016	0,0016
FeSO ₄ ·7H ₂ O	242000	0,0050	0,0050	0,0500
EDTA	34000	0,0500	0,0500	0,0000

KOH	216000	0,0310	0,0310	0,0000
H ₃ BO ₃	370000	0,0114	0,0114	0,0001
MnCl ₂ ·4H ₂ O	688000	0,0014	0,0014	0,0000
CaCl ₂ ·2H ₂ O	232000	0,0000	0,0250	0,0000
NaCl	94000	0,0250	0,0250	0,0000
NaHCO ₃	160000	1,1000	1,1000	1,1000
Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	1004000	0,0007	0,0012	0,0050
CoCl ₂ ·6H ₂ O	1336000	0,0004	0,0004	0,0005
CaSO ₄	502000	0,0000	0,0000	0,1000
NaVO ₃	4320000	0,0000	0,0000	0,0001
MnSO ₄ ·H ₂ O	588000	0,0000	0,0000	0,0050
NiCl ₂ ·6H ₂ O	576000	0,0000	0,0000	0,0000
D-Glucosa	100000	3,0000	0,0000	0,0000
Ácido succínico	481500	1,0000	0,0000	0,0000
Acetato de sodio	112500	1,0000	0,0000	0,0000
Ácido acético	126000	0,0000	0,0000	0,6326
Ácido propiónico	111000	0,0000	0,0000	0,1030
Ácido butírico	512000	0,0000	0,0000	0,1680
Ácido valérico	314000	0,0000	0,0000	0,0400
Ácido isobutírico	420000	0,0000	0,0000	0,0564
Costo total		1432,8190	376,1460	830,2728

Tabla 2. Tasas de crecimiento, rendimiento de fijación y producción de nitrógeno en la fase 2 de bacterias fijadoras de nitrógeno.

Etapa 2: Cultivo de la cepa pura Z y los consorcios S y D									
Días	Tasa de crecimiento(1/d)			Rendimiento (mg N/mg AGVs)			Producción (mg N)		
	s	d	z	s	d	z	s	d	z
1	0,674	0,090	0,075	0,011	0,005	0,001	7	2,1	0,6
14									
14	0,062	0,105	0,175	0,049	0,014	0,053	4,1	2,2	2,9
22									
22	0,114	0,330	0,229	0,045	0,034	0,005	2,1	3,2	0,2
30									

Tabla 3. Tasa de crecimiento y rendimiento en configuraciones de *Chlorella* 1, 2 y 3, tomando los del inicio y del final.

	Configuración 1	Configuración 2	Configuración 3
--	-----------------	-----------------	-----------------

Efluente	Tasa de crecimiento (1/d)	Tasa de crecimiento promedio (1/d)	Rendimiento promedio (cell/mg N)	Tasa de crecimiento promedio (1/d)	Rendimiento promedio (DO 690/mg N)
S	409.58	5.18 ± 0.64	73.32 ± 9.07	0.039 ± 0.014	0.105 ± 0.015
D	132.08	82.59 ± 18.74	1140.82 ± 258.79	0.113 ± 0.032	0.239 ± 0.067
R	151.25			0.064 ± 0.009	0.162 ± 0.022
Z		72.96 ± 19.13	694.61 ± 182.09	0.062 ± 0.015	0.212 ± 0.05
Control	196.67	87.41 ± 7.88	1250.67 ± 112.79	0.048 ± 0.004	0.104 ± 0.009

Link **tabla 4**: Medios en literatura para el cultivo de fijadores de nitrógeno.

[Tabla de comparación de medios - Hojas de cálculo de Google](#)

Link **tabla 5**: Cronograma de actividades, presupuesto y análisis estadístico para *C.sorokiniana* configuración 2 y 3.

[Análisis estadístico - Hojas de cálculo de Google](#)

Figura 1: Resultado PCR con el gen nifH

