

UNIVERSIDAD DEL VALLE DE GUATEMALA
Facultad de Ingeniería



Generación de biopigmentos en solución líquida a partir de biofermentaciones bacterianas aplicados a la tinción de fibras textiles

Trabajo de graduación presentado por Celeste Esmeralda Martínez García para optar al grado académico de Licenciada en Ingeniería en Biotecnología Industrial

Guatemala,
2025

UNIVERSIDAD DEL VALLE DE GUATEMALA
Facultad de Ingeniería



Generación de biopigmentos en solución líquida a partir de biofermentaciones bacterianas aplicados a la tinción de fibras textiles

Trabajo de graduación presentado por Celeste Esmeralda Martínez García para optar al grado académico de Licenciada en Ingeniería en Biotecnología Industrial

Guatemala,
2025

Vo.Bo:

(f) 

Ing. Luis Ernesto Núñez Gonzales, M.Sc.


Tribunal examinador:

(f) 

Ing. Luis Ernesto Núñez Gonzales, M.Sc.

(f) _____

Ing. Gamaliel Zambrano Ruano, M.Sc.

(f) 

Ing. Carmen Alicia Ortiz Pineda, M.A.

Fecha de aprobación de examen de graduación:

Guatemala, 06 de febrero de 2025

Prefacio

Este trabajo de graduación surge por el interés de encontrar alternativas que sean amigables con el ambiente a productos ya existentes. A lo largo de la carrera me fui interesando por los pigmentos microbianos y en varias asignaturas me di cuenta de que para lograr utilizar estos en textiles se suelen utilizar método de extracción y purificación que utilizan elementos también contaminantes. Es por ello por lo que surge mi curiosidad por querer encontrar una forma más simple y que necesitara de menos reactivos dañinos de llevar los pigmentos a la tela.

Quiero agradecer sobre todo a Dios, quien es mi guía y fortaleza, que nunca me suelta la mano incluso en los momentos más difíciles de mi vida.

Quiero agradecer también a mi mamá quien alentó mi curiosidad y me inculcó de pequeña el amor por el aprendizaje y a mi papá quien me impulso a seguir mi sueño de estudiar esta carrera universitaria. Agradezco a mi familia, mi madrina y mis abuelos, quienes me brindaron la oportunidad de estudiar en la Universidad del Valle de Guatemala y cumplir mi sueño de estudiar una carrera científica, y por todo su apoyo a lo largo de estos años. También quiero agradecer a mis hermanos y mis tías por su cariño y respaldo incondicional, y a mis amigas y compañeras, quienes siempre estuvieron a mi lado para apoyarme en cada paso de este camino.

También quiero agradecer a mi asesor MBA &MSC Luis Ernesto Núñez, quien fue mi asesor y guía no solo en este trabajo sino a lo largo de toda la carrera. Apoyándonos a mí y a mis compañeras durante esta etapa universitaria. Y al director de carrera MBA Gamaliel Zambrano quien me apoyo en lo que necesitara, desde brindarme equipos, reactivos, guía, consejos y por supuesto autorizarme a usar todas las instalaciones del Departamento de ing. Química de la Universidad del Valle de Guatemala.

Igualmente quiero agradecer al departamento de Bioquímica de la Universidad del Valle de Guatemala, por prestarme sus instalaciones, equipos e irme orientando durante la fase de experimentación. Al departamento de Ing. en alimentos de la Universidad del Valle de Guatemala, quienes me capacitaron y prestaron sus equipos para el análisis colorimétrico, en especialmente a Ilana quien estuvo siempre al pendiente de mi trabajo y avance. Al laboratorio del programa en ciencia y tecnología de alimentos de la Universidad del Valle de Guatemala por prestarme sus equipos e instalaciones para realizar los análisis de nitrógeno. A Jugos Naturales por brindarme el agua de coco que utilice como base de mis medios de cultivo.

Índice

Resumen.....	XIV
Abstract.....	XV
Abreviaturas.....	XVI
I. Introducción.....	1
II. Antecedentes.....	2
III. Justificación.....	3
IV. Objetivos.....	4
A. General:.....	4
B. Específicos:.....	4
VII. Marco teórico.....	5
A. Pigmentos comerciales.....	5
B. Pigmentos bacterianos.....	5
C. Fermentación microbiana.....	15
D. Agua de coco como medio de fermentación.....	17
E. cuantificación de células.....	17
F. Medición de color.....	22
G. Aplicación en la industria textil.....	25
H. Mecanismos de anclaje de biopigmentos en fibras de algodón.....	27
IV. Metodología.....	28
A. Activar las bacterias.....	30
B. Preparación de medios.....	32
1. Medio líquido de glucosa.....	32
2. Medio líquido de lactosa.....	33
3. Medio líquido agua de coco.....	33
C. Crecimiento de cepas en medios preparados.....	33
D. Viabilidad de células.....	34

E.	Cuantificación de Nitrógeno por método de Kjeldahl	35
F.	Cuantificación de Fosfato.....	37
G.	Tinción.....	38
H.	Análisis colorimétrico	39
VI.	Definición de variables	40
VII.	Resultados.....	41
A.	Formulación de medios de cultivo líquidos usados en el crecimiento de las cepas bacterianas para la producción de pigmentos.	41
B.	Comparación del crecimiento de producción de pigmentos en diferentes medios de cultivo, para identificar el de mayor rendimiento.	42
C.	Variación de Nitrógeno y Fósforo.....	45
D.	Comparación de la intensidad/saturación por medio de tinción en autoclave de los pigmentos obtenidos con los colorantes comerciales como sustituto de origen biológico a los tintes actuales	62
VIII.	Discusión.....	72
IX.	Conclusiones	80
X.	Recomendaciones.....	82
XI.	Bibliografía	83
XII.	Anexos	88
A.	Datos originales	88
B.	Datos calculados.....	95
C.	Balance de masa	100
D.	Cálculos muestra	103
E.	Estadística.....	106
F.	Costos por formulación	110
G.	Especificaciones de los equipos utilizados	115
H.	Microorganismos utilizados	116
I.	Esquema del proceso de producción y tinción.....	117

Lista de cuadros

Cuadro	Página
Cuadro 1 Formulación de medios de cultivo propios	41
Cuadro 2 Análisis colorimétrico de los medios de cultivos preparados	45
Cuadro 3 Análisis colorimétrico de los medios de cultivos α , β & γ con modificaciones en sus concentraciones de nitrógeno antes de la inoculación.	46
Cuadro 4 Análisis colorimétrico de los medios de cultivos con las modificaciones en la concentración de nitrógeno para la cepa P.A. a las 52 h.....	52
Cuadro 5 Análisis colorimétrico de los medios de cultivos con las modificaciones en la concentración de nitrógeno para la cepa P.B. a las 52 h.....	53
Cuadro 6 Análisis colorimétrico de los medios de cultivos con las modificaciones en la concentración de nitrógeno para la cepa R.a. a las 52 h	53
Cuadro 7 Análisis colorimétrico de los medios de cultivos con las modificaciones en la concentración de fósforo y magnesio antes de inocular	55
Cuadro 8 Análisis colorimétrico de los medios de cultivos con las modificaciones en la concentración de nitrógeno para la cepa P.A. a las 52 h.....	57
Cuadro 9 Análisis colorimétrico de los medios de cultivos con las modificaciones en la concentración de nitrógeno para la cepa P.B. a las 52 h.....	57
Cuadro 10 Análisis colorimétrico de los medios de cultivos con las modificaciones en la concentración de nitrógeno para la cepa R.a. a las 52 h	58
Cuadro 11 Análisis de varianza para fermentaciones líquidas de P.A.	59
Cuadro 12 Análisis de varianza para fermentaciones líquidas de P.B.	60
Cuadro 13 Análisis de varianza para fermentaciones líquidas de R.a.....	61
Cuadro 14 Espacio Ciel*a*b de la tinción de pigmentos sin modificación de medio de cultivo por método de autoclave luego de 52h de fermentación	62
Cuadro 15 Espacio Ciel*a*b de la tinción de pigmentos optimizados a 1/2 veces la concentración inicial de nitrógeno y variando las concentraciones de fósforo, por método de autoclave luego de 52h de fermentación para la cepa P.A.	64
Cuadro 16 Espacio Ciel*a*b de la tinción de pigmentos optimizados a 0.5 veces la concentración inicial de nitrógeno y variando las concentraciones de fósforo	66
Cuadro 17 Espacio Ciel*a*b de la tinción de pigmentos optimizados a 0.5 veces la concentración inicial de nitrógeno y variando las concentraciones de fósforo, por método de autoclave luego de 52h de fermentación.....	68
Cuadro 18 Espacio Ciel*a*b de la tinción de pigmentos comerciales	69

Cuadro 19 Porcentaje de error entre los vectores de color obtenidos por tinción en autoclave para P.A. al compararlo con pigmentos comerciales	70
Cuadro 20 Porcentaje de error entre los vectores de color obtenidos por tinción en autoclave para P.B. al compararlo con pigmentos comerciales.....	70
Cuadro 21 Porcentaje de error entre los vectores de color obtenidos por tinción en autoclave para R.a. al compararlo con pigmentos comerciales	71
Cuadro 22 Concentración $\pm 1 \times 10^{-10}$ de células P.A./mL en medios de cultivo iniciales	88
Cuadro 23 Concentración $\pm 1 \times 10^{-10}$ de células P.B./mL en medios de cultivo iniciales	89
Cuadro 24 Concentración $\pm 1 \times 10^{-10}$ de células R.a. /mL en medios de cultivo iniciales	90
Cuadro 25 Concentración de cell/mL viables de las bacterias en los medios de cultivo modificando a concentración de nitrógeno.....	91
Cuadro 26 Concentración cell/mL en los medios de cultivo modificando a concentración de fósforo y magnesio en el tiempo.....	92
Cuadro 27 Concentración g/mL de nitrógeno en los medios de cultivo modificando a concentración de nitrógeno en el tiempo	93
Cuadro 28 Concentración g/mL de fosfatos en los medios de cultivo modificando después de 52h	94
Cuadro 29 Concentración cantidades de reactivos en las tres formulaciones originales.....	95
Cuadro 30 Concentración cantidades de reactivos en las formulaciones con la mitad de nitrógeno	95
Cuadro 31 Concentración cantidades de reactivos en las formulaciones con un cuarto de nitrógeno.....	96
Cuadro 32 Concentración cantidades de reactivos en las formulaciones con la mitad de nitrógeno y 1.5 veces la concentración inicial de fósforo	96
Cuadro 33 Concentración cantidades de reactivos en las formulaciones con un cuarto de nitrógeno y el doble de la concentración inicial de fósforo	97
Cuadro 34 Valores $CieL^*a^*b$ y valor del vectorial del color para P.A.	97
Cuadro 35 Valores $CieL^*a^*b$ y valor del vectorial del color para P.B.	98
Cuadro 36 Valores $CieL^*a^*b$ y valor del vectorial del color para R.a.....	99
Cuadro 37 Balance de masa para los diferentes medios de cultivo modificado la cantidad de nitrógeno	101

Cuadro 38 Balance de masa para los medios de cultivo modificado la cantidad de fósforo.	102
Cuadro 39 Resumen del modelo para fermentaciones de P.A.....	107
Cuadro 40 Resumen del modelo para fermentaciones de P.B.....	108
Cuadro 41 Resumen del modelo para fermentaciones de R.a.	109
Cuadro 42 Costo de fabricación del medio de cultivo α	110
Cuadro 43 Costo de fabricación del medio de cultivo α 1/2N.....	110
Cuadro 44 Costo de fabricación del medio de cultivo α 1/2N2P	111
Cuadro 45 Costo de fabricación del medio de cultivo β	111
Cuadro 46 Costo de fabricación del medio de cultivo β 1/2N.....	112
Cuadro 47 Costo de fabricación del medio de cultivo β 1/2N2P	112
Cuadro 48 Costo de fabricación del medio de cultivo γ	113
Cuadro 49 Costo de fabricación del medio de cultivo γ 1/2N.....	113
Cuadro 50 Costo de fabricación del medio de cultivo δ 1/2N2P	114
Cuadro 51 Especificaciones de los equipos utilizados	115
Cuadro 52 Características de los microorganismos utilizados	116

Lista de figuras

Figura	Página
Figura 1 Estructura de Clorofila y Bacterioclorofila	7
Figura 2 Estructura de la Ficoeritrina obtenida de <i>Gloeobacter Violaceus</i>	8
Figura 3 Estructura química de β -caroteno (caroteno) (a) y zeaxantina (xantofila) (b).....	9
Figura 4 Estructura general de las fenazinas	11
Figura 5 Estructura química de la prodigiosina	12
Figura 6 Estructuras de distintos tipos de melaninas.....	13
Figura 7 Estructura de la Riboflavina	14
Figura 8 Curva de crecimiento bacteriano	16
Figura 9 Funcionamiento del espectrofotómetro UV-Vis	19
Figura 10 Diagrama de representación del espacio de color RGB.....	23
Figura 11 Diagrama de representación del espacio de Color CIEL a^*b y CIEL $*C^*h^*$	25
Figura 12. Imagen de medios de cultivos	41
Figura 13 Imagen de comparación de crecimiento de la cepa P.A. en diferentes medios de cultivo	42
Figura 14 Imagen de comparación de crecimiento de la cepa P.B. en diferentes medios de cultivo	42
Figura 15 Imagen de comparación de crecimiento de la cepa R.a. en diferentes medios de cultivo	43
Figura 16 Gráfica de crecimiento de la cepa P.A. en los diferentes medios de cultivo.....	43
Figura 17 Gráfica de crecimiento de la cepa P.B. en los diferentes medios de cultivo.....	44
Figura 18 Gráfica de crecimiento de la cepa R.a. en los diferentes medios de cultivo.....	44
Figura 19 Imagen de varios medios de cultivo sin inocular	45
Figura 20 Gráfica de concentración de crecimiento de las distintas cepas en el medio α de cultivo modificando la concentración inicial de nitrógeno.....	46
Figura 21 Gráfica de concentración de crecimiento de la cepa P.A. en el medio α de cultivo modificando la concentración inicial de nitrógeno.....	47
Figura 22 Gráfica de concentración de crecimiento de la cepa P.B. en el medio α de cultivo modificando la concentración inicial de nitrógeno.....	47

Figura 23 Gráfica de concentración de crecimiento de la cepa R.a. en el medio α de cultivo modificando la concentración inicial de nitrógeno.....	48
Figura 24 Gráfica de concentración de crecimiento de las distintas cepas en el medio β modificando la concentración inicial de nitrógeno.....	48
Figura 25 Gráfica de concentración de crecimiento de la cepa P.A. en el medio β de cultivo modificando la concentración inicial de nitrógeno.....	49
Figura 26 Gráfica de concentración de crecimiento de la cepa P.B. en el medio β de cultivo modificando la concentración inicial de nitrógeno.....	49
Figura 27 Gráfica de concentración de crecimiento de la cepa R.a. en el medio β de cultivo modificando la concentración inicial de nitrógeno.....	50
Figura 28 Gráfica de concentración de crecimiento de las distintas cepas en el medio γ de cultivo modificando la concentración inicial de nitrógeno.....	50
Figura 29 Gráfica de concentración de crecimiento de la cepa P.A. en el medio γ de cultivo modificando la concentración inicial de nitrógeno.....	51
Figura 30 Gráfica de concentración de crecimiento de la cepa P.B. en el medio γ de cultivo modificando la concentración inicial de nitrógeno.....	51
Figura 31 Gráfica de concentración de crecimiento de la cepa R.a. en el medio γ de cultivo modificando la concentración inicial de nitrógeno.....	52
Figura 32 Gráfica de concentración de fosfato para las diferentes cepas en los diferentes medios de cultivo después de 52 h.....	54
Figura 33 Imagen de varios medios de cultivo con modificación en la concentración de fósforo y magnesio sin inocular.....	54
Figura 34 Gráfica de concentración de crecimiento de la cepa P.A. en los diferentes medios de cultivo con la modificación de la concentración de fósforo α & β y magnesio δ	55
Figura 35 Gráfica de concentración de crecimiento de la cepa P.B. en los diferentes medios de cultivo con la modificación de la concentración de fósforo α & β y magnesio δ	56
Figura 36 Gráfica de concentración de crecimiento de la cepa R.a. en los diferentes medios de cultivo con la modificación de la concentración de fósforo α & β y magnesio δ	56
Figura 37 Diagrama de Pareto para las fermentaciones de P.A.	59
Figura 38 Diagrama de Pareto para las fermentaciones de P.B.....	60
Figura 39 Diagrama de Pareto para las fermentaciones de R.a.	61

Figura 40 Tinción de pigmentos sin modificación de medio de cultivo por método de autoclave luego de 52h de fermentación	62
Figura 41 Tinción de cuadros de 5x5cm de tela de algodón con biopigmentos de P.A. de los medios de cultivo modificados con nitrógeno, fósforo y magnesio después de 52 horas de fermentación	63
Figura 42 Tinción de cuadros de 5x5cm de tela de algodón con biopigmentos de P.B. de los medios de cultivo modificados con nitrógeno, fósforo y magnesio después de 52 horas de fermentación	65
Figura 43 Tinción de cuadros de 5x5cm de tela de algodón con biopigmentos de P.A. de los medios de cultivo modificados con nitrógeno, fósforo y magnesio después de 52 horas de fermentación	67
Figura 44 Tinción de cuadros de 5x5cm de tela de algodón con 0.02g/L de colorantes comerciales	69
Figura 45. Balance de masa para la producción de biopigmento	100
Figura 46 Diagrama de Pareto para medios de cultivo que producen pigmento ...	106
Figura 47 Gráficas factoriales para resultados de las fermentaciones de P.A.	107
Figura 48 Gráficas factoriales para resultados de las fermentaciones de P.B.	108
Figura 49 Gráficas factoriales para resultados de las fermentaciones de R.a.	109
Figura 50 Diagrama de bloques del proceso de producción y tinción.....	117

Resumen

Los pigmentos bacterianos podrían ser la nueva revolución en la industria de los colorantes comerciales. Esto debido a la creciente necesidad de una producción alternativa a los colorantes sintéticos que se utilizan hoy en día. El objetivo de la presente investigación fue generar pigmentos bacterianos por medio de biofermentaciones en una solución líquida para tinción de fibras textiles. Para ello se formularon 3 soluciones diferentes para 3 cepas bacterianas P.A., P.B. & R.a. Posteriormente se evaluaron los rendimientos de producción en cada medio y se mejoró la formulación por medio de variaciones de las concentraciones de fósforo y nitrógeno con el fin de obtener mayor cantidad de biopigmento. Finalmente se tiñó Cuadros de 5X5cm de tela de algodón y se comparó con los tintes comerciales al teñir la fibra de algodón. Los resultados mostraron que los medios de cultivo α , β y γ (con fuentes de carbono como sacarosa, lactosa y azúcares fermentables del agua de coco) lograron viabilidades bacterianas mayores a 2.3×10^3 UFC/mL en 24 horas, aunque no se detectó inicialmente producción de pigmentos. En términos de biomasa, P.A. alcanzó $7.62E+03$ UFC/mL en el medio β , mientras que P.B. y R.a. lograron mayores rendimientos en el medio α , con $6.54E+03$ y $5.39E+04$ UFC/mL, respectivamente. La optimización de nutrientes (reducción del nitrógeno a la mitad y aumento del fósforo al doble) incrementó la producción de biopigmentos, obteniendo Valores P para nitrógeno de 0.02, 0.046 y 0.21 g/L para P.A., P.B. y R.a., respectivamente, y de fósforo de 0.02, 0.748 y 0.104. Por otro lado, la tinción de telas generó tonos como café-verdoso, amarillo, beige y naranja; sin embargo, los valores CIEL*a*b disminuyeron hasta en dos tercios, indicando una pérdida de luminosidad y saturación en comparación con los pigmentos en solución. Se destacó que los biopigmentos obtenidos en condiciones óptimas (P.A. en α con 1/2N y 2P, y R.a. en β con 1/2N y 2P) presentaron un índice de error menor al 1% en comparación con el colorante comercial verde, demostrando que podrían ser una alternativa viable a los pigmentos sintéticos en la industria textil.

Abstract

Bacterial pigments could be the new revolution in the commercial dye industry. This is due to the growing need for an alternative production to the synthetic dyes currently used. The objective of this research was to generate bacterial pigments through biofermentations in a liquid solution for dyeing textile fibres. For this purpose, three different solutions were formulated for three bacterial strains: P.A., P.B., and R.a. Subsequently, the production yields in each medium were evaluated, and the formulation was improved by varying the concentrations of phosphorus and nitrogen in order to obtain a greater amount of biopigment. Finally, 5x5 cm squares of cotton fabric were dyed and compared to commercial dyes when dyeing the cotton fibre. The results showed that the culture media α , β , and γ (with carbon sources such as sucrose, lactose, and fermentable sugars from coconut water) achieved bacterial viabilities greater than 2.3×10^3 CFU/mL in 24 hours, although no pigment production was initially detected. In terms of biomass, P.A. reached $7.62E+03$ CFU/mL in medium β , while P.B. and R.a. achieved higher yields in medium α , with $6.54E+03$ and $5.39E+04$ CFU/mL, respectively. The optimization of nutrients (reducing nitrogen by half and doubling phosphorus) increased the production of biopigments, obtaining P values for nitrogen of 0.02, 0.046, and 0.21 g/L for P.A., P.B., and R.a., respectively, and for phosphorus of 0.02, 0.748, and 0.104. On the other hand, the dyeing of fabrics generated tones such as olive green, yellow, beige, and orange; however, the CIEL*a*b values decreased by up to two-thirds, indicating a loss of lightness and saturation compared to pigments in solution. It was highlighted that the biopigments obtained under optimal conditions (P.A. in α with 1/2N and 2P, and R.a. in β with 1/2N and 2P) had an error index of less than 1% compared to the commercial green dye, demonstrating that they could be a viable alternative to synthetic pigments in the textile industry.

Abreviaturas

μL: microlitro

mL: mililitro

L: litro

g: gramo

UFC: Unidades formadoras de colonias

P.A.: *Pseudomonas aeruginosa*

P.B.: *Pseudomonas putida*

R.a.: *Rhodococcus equi*

d: días

h: horas

cell: Células

Conc: Concentración

GRAS: generalmente reconocido como seguro

min: minutos

M: molar

N: nitrógeno

P: fósforo

Mg: magnesio

p/v: peso/volumen

v/v: volumen/volumen.

UV: ultravioleta

\$: dólar

Q: quetzal

I. Introducción

Cada vez hay menos recursos disponibles y cada vez más personas que demandan productos en mayor cantidad. Esta situación que está llevando a varias industrias a encontrar alternativas para su proceso de producción. La industria textil, no es una excepción y enfrenta un desafío ambiental crucial: el impacto negativo de sus procesos de producción, particularmente en el teñido de telas. Los pigmentos son sustancias químicas que otorgan color a los materiales debido al efecto óptico de la refracción de la luz solar. Generalmente, los pigmentos se utilizan en la industria textil para la coloración de prendas, en la industria de alimentos como intensificadores del color o aditivo. Y los colorantes sintéticos, comúnmente utilizados, liberan sustancias nocivas al medio ambiente, amenazando la salud humana y los ecosistemas.

Es por ello por lo que surge la necesidad de alternativas sostenibles que minimicen el impacto ambiental de la industria textil, y recientemente sus esfuerzos se centran en explorar el potencial de los pigmentos naturales y microbianos como una solución ecológica para el teñido de telas. Los primeros son extraídos de fuentes renovables como plantas, insectos y minerales, no liberan toxinas dañinas, lo que los hace ecológicos y sostenibles. Aunque actualmente su proceso es más artesanal y se trabajan en pequeña o mediana escala debido al tiempo que se debe invertir para obtenerlos y que las condiciones de teñido son difíciles de llevar a una escala de producción masiva sin irrumpir en el ecosistema (Rey, 2021). Por otro lado, los pigmentos bacterianos y fúngicos son una alternativa que, al requerir menos tiempo de producción, espacio utilizado y un solo paso en su proceso de asolación a la tela parecen ser una alternativa viable al problema de los tintes sintéticos (Lagashetti, A. C., Dufossé, L., Singh, S. K., & Singh, P. N. , 2019).

El presente trabajo de graduación tiene como objetivo generar pigmentos bacterianos por medio de biofermentaciones en una solución líquida para tinción de fibras textiles. Para el efecto de primero se van a reactivar las bacterias a utilizar en medios comerciales de caldo y agar nutritivo, Después se van a formular 3 medios de cultivo para 3 cepas de bacterias (P.A., P.B. y R.a.) y evaluar si estos son aptos para el crecimiento de estas. Seguidamente se van a cambiar las condiciones de Nitrógeno y Fósforo de los medios y se va a evaluar la producción de pigmentos de las 3 bacterias para encontrar la formulación a la que mayor intensidad y saturación de pigmentos dé. Por último, se va a teñir fibras textiles con los pigmentos producidos en los medios optimizados.

II. Antecedentes

Los tintes sintéticos contienen compuestos derivados del petróleo u otras fuentes no renovables, lo que causa que liberen sustancias químicas nocivas durante su producción y uso, contaminando agua, suelo y aire. Ante esta problemática, ha surgido un interés en la búsqueda de alternativas más sostenibles, como los pigmentos microbianos que tiñen fibras en un solo proceso y disminuye el consumo del agua. Sin embargo, el rendimiento de estos colorantes naturales se ve afectado según la formulación de su medio de cultivo el cual debe favorecer el crecimiento de las bacterias, así como la producción del pigmento. Para ello Flores Escobar 2021, propone 3 medios de cultivos bacterianos que inducen la producción de los colorantes naturales en microorganismo siendo estas las siguientes: 1) formulación con concentración sacarosa de 10 g/L, de extracto de levadura de 3 g/L y de fosfatos de 0.5 g/L. 2) formulación con concentración sacarosa de 30 g/L, de extracto de levadura de 3 g/L y de fosfatos de 1 g/L., y 3) formulación con concentración sacarosa de 30 g/L, de extracto de levadura de 2 g/L y de fosfatos de 1.5 g/L. También, según Sánchez et al. (2005), propone el agua de coco como medio de cultivo los microorganismos, ya que se observó eficiencia en la conversión del sustrato en biomasa en comparación con otros medios de cultivo comerciales. Además, el agua de coco no requiriere la adición de nutrientes adicionales para el crecimiento de los microorganismos lo cual lo vuelve rentable económicamente.

III. Justificación

Desde los inicios de la civilización, el ser humano ha buscado siempre destacarse entre sus semejantes, utilizando diferentes estrategias. Se han utilizado adornos como plumas, cuernos, dientes, conchas, piedras y pieles de diferentes animales, pero sobre todo se han utilizado colores para poder diferenciarse unos de otros. Al principio, estos colores eran de origen natural, derivados de hojas, flores y animales, lo cual dificulta encontrar ciertas tonalidades debido a su largo y laborioso proceso de extracción (Moya, 2010). Sin embargo, esto cambió con la llegada de los tintes sintéticos a finales del siglo XVII, cuando Woulfe desarrolló el primero de ellos. Desde entonces, se logró el acceso a colorantes de diversas tonalidades en todo el mundo (Escudero, C. & Lires, M., 2006)

Debido a la masificación de los pigmentos, la industria de los tintes y colorantes es una de las más importantes a nivel mundial, con un mercado estimado de \$80 mil millones en 2023. Sin embargo, esta industria también tiene un impacto negativo en el medio ambiente, ya que la producción de tintes sintéticos conlleva la liberación de residuos tóxicos a las aguas residuales. Es por ello por lo que, en los últimos años, se ha incrementado la demanda de tintes y colorantes naturales, que son más respetuosos con el medio ambiente. El mercado actual de estos es de aproximadamente \$32 mil millones según las estimaciones de exactitud consultancy en el año 2022 (Consultancy., Exactitude, 2022)). Sin embargo, en Guatemala existe un gran potencial de mercado debido a la industria textil (representando el 2.5% del PIB) y la industria alimentaria (representando el 12.5% del PIB) según el Banco de Guatemala (Banco de Guatemala, 2022).

Es por ello, que este trabajo de graduación se centró en la generación de biopigmentos a partir de cepas bacterianas y su posible uso en la industria textil como alternativa a los colorantes sintéticos. Esto se logró mediante la evaluación de diferentes formulaciones líquidas como medio de cultivo para los microorganismos utilizados, con el fin de determinar las condiciones para su crecimiento.

IV. Objetivos

A. General:

Generar pigmentos bacterianos por medio de biofermentaciones en una solución líquida para tinción de fibras textiles.

B. Específicos:

1. Formular tres medios de cultivo líquidos e incoloros u claros para el crecimiento de las cepas bacterianas en la producción del pigmento.
2. Comparar el crecimiento de producción de pigmentos de cada medio de cultivo para determinar la que produce el mayor rendimiento.
3. Modificar las concentraciones de fósforo y nitrógeno para determinar si estos factores influyen en el cambio de coloración o intensidad de los pigmentos.
4. Teñir fibras textiles usando autoclave y comparar la intensidad/saturación con los colorantes comerciales como sustituto de origen biológico a la tinción.

VII. Marco teórico

A. Pigmentos comerciales

Los pigmentos comerciales son sustancias que se utilizan para dar color a diversos productos, como pinturas, textiles, plásticos y alimentos. Estos se pueden clasificar en dos grupos principales: pigmentos orgánicos e inorgánicos. Los pigmentos orgánicos se producen a partir de compuestos orgánicos, como hidrocarburos, aminoácidos o fenoles. Algunos ejemplos de pigmentos orgánicos son la anilina, el azoico y la antraquinona. Mientras que los pigmentos inorgánicos se producen a partir de compuestos inorgánicos, como óxidos, sulfuros o selenuros. Algunos ejemplos de pigmentos inorgánicos son el dióxido de titanio, el óxido de hierro, el cromato de plomo y el cadmio.

Los pigmentos comerciales tienen una serie de características que los hacen adecuados para su uso en una amplia gama de aplicaciones. Estas características incluyen la solubilidad pues los pigmentos comerciales son insolubles en agua lo que permite dar color a los productos sin que se disuelvan o se desprendan, la estabilidad la luz, al calor y a los productos químicos, lo que les permite mantener su color y sus propiedades a lo largo del tiempo, y la resistencia ante los lavados, a la abrasión y a otros factores de desgaste, lo que les permite mantener su color y su apariencia en condiciones de uso normales (Marcano, 2018).

B. Pigmentos bacterianos

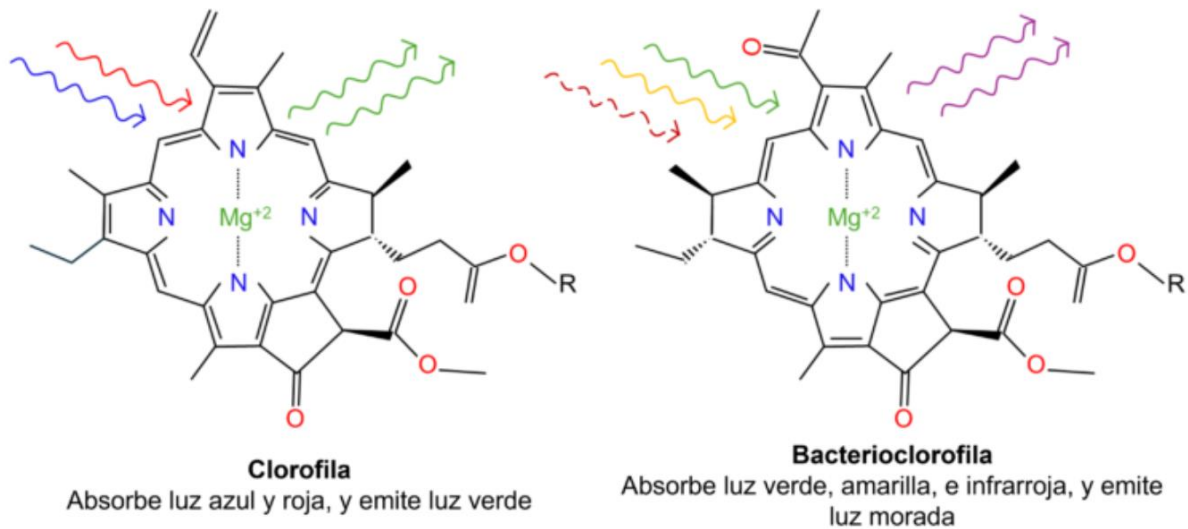
Los pigmentos bacterianos son compuestos orgánicos producidos por bacterias, reconocidos por su capacidad para impartir color a una amplia variedad de materiales. Estos pigmentos se clasifican principalmente en fotosintéticos y no fotosintéticos, cada uno con características estructurales y funcionales distintivas. A nivel molecular, los biopigmentos presentan una diversidad estructural notable, basada en esqueletos como isoprenoides, porfirinas y flavonoides. Estos grupos funcionales les confieren propiedades cromáticas y biológicas únicas, lo que los hace atractivos para diversas aplicaciones, desde la coloración de textiles hasta la formulación de productos cosméticos, pero que en esencia cumplen funciones para ayudar a la supervivencia del microorganismo, que van desde protección contra la

luz ultravioleta hasta toxinas (David, 2009). En contraste, los pigmentos sintéticos, diseñados para optimizar su rendimiento industrial, suelen tener estructuras más simples y homogéneas (Marcano, 2018).

Los pigmentos fotosintéticos son producidos por bacterias fotosintéticas, como las cianobacterias y las bacterias púrpuras. Estos pigmentos absorben la luz y la utilizan para convertir la energía solar en energía química. Los pigmentos fotosintéticos más comunes son las clorofilas, las ficobiliproteínas, los carotenoides y las bacterioclorofilas.

Las clorofilas a y b son los pigmentos fotosintéticos predominantes en organismos fotoautótrofos aeróbicos, como plantas superiores, algas y cianobacterias. Estos pigmentos poseen máximos de absorción en las regiones del espectro visible correspondientes al rojo y al azul, lo que confiere a las hojas, algas y cianobacterias su característico color verde. Las clorofilas son moléculas de gran interés debido a su papel central en la fotosíntesis, proceso que constituye la base de la producción de biomasa y bioenergía. Dos ejemplos de bacterias clorofilas son: *Prochlorococcus* y *Synechococcus* (cianobacterias), ambas son productoras de clorofila a. En contraste, los microorganismos fotoautótrofos anaeróbicos, como las bacterias púrpuras y las bacterias verdes del azufre, realizan fotosíntesis no oxigénica. En este proceso en lugar de producir oxígeno a partir de dióxido de carbono, convierten el sulfuro de hidrógeno en azufre. Para ello, estos organismos emplean otra familia de pigmentos llamados bacterioclorofilas, que son estructuralmente distintos de las clorofilas y absorben otras longitudes de onda como la luz verde, amarilla o incluso infrarroja. Esta característica les permite aprovechar fuentes de luz menos energéticas y prosperar en ambientes con poca luminosidad, como las profundidades acuáticas o el suelo. Por ejemplo, *Chlorobium tepidum*, una bacteria verde del azufre utiliza bacterioclorofila c (David, 2009).

Figura 1 Estructura de Clorofila y Bacterioclorofila

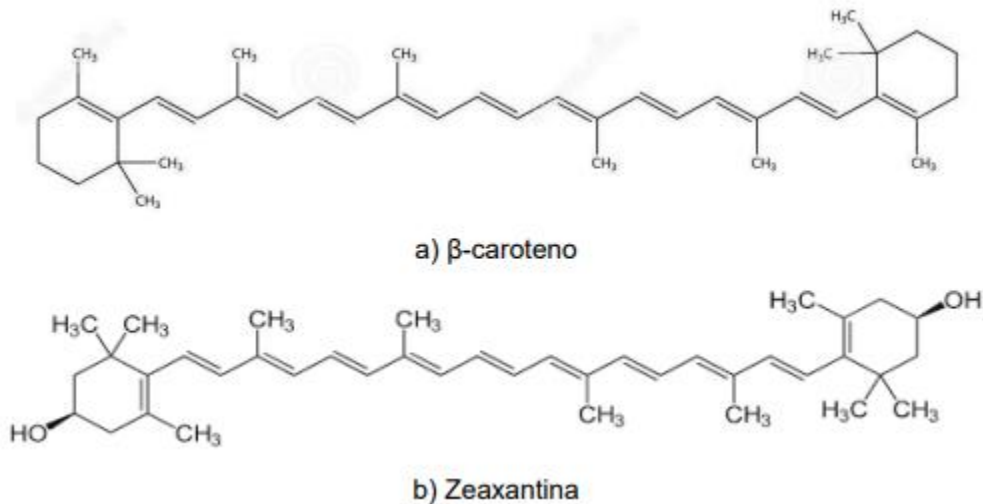


Fuente: (Coelho, L. F., Kaltenecker, L., Zinder, S., Philpot, W., Price, T. L., & Hamilton, T. L., 2024).

Otra estructura en las bacterias fotosintéticas consideradas pigmentos son las ficobiliproteínas. Estas proteínas pigmentadas presentes en cianobacterias y algas rojas desempeñan un papel crucial en la captación de luz durante la fotosíntesis. Estos pigmentos se organizan en estructuras supramoleculares conocidas como ficobilisomas, localizados en la membrana tilacoidal. Las ficobiliproteínas más estudiadas son la ficocianina, de color azul, y la ficoeritrina, de color rojo. La ficocianina absorbe principalmente en la región amarilla y naranja del espectro visible, mientras que la ficoeritrina lo hace en la región verde. Esta complementariedad en la absorción de luz permite a las cianobacterias y algas rojas aprovechar una amplia gama del espectro lumínico (López-Arzuaga, 2016). Un ejemplo de microorganismos que produce ficocianina y ficoeritrina es *Spirulina platensis* (cianobacteria). Lo que tienen en común estas estructuras son anillos de carbono y un componente nitrogenado, lo que da como resultado una absorción y proyección de color. Esto se puede ver reflejado en la Figura 2.

absorber luz en la región visible del espectro electromagnético. Esta capacidad de absorción de luz permite a los carotenoides transferir energía a los centros de reacción fotosintéticos, contribuyendo así a la fotosíntesis. Debido a que los carotenoides son pigmentos accesorios, la producción de carotenoides en bacterias fotosintéticas está regulada por factores ambientales, como el pH, el oxígeno disuelto, la intensidad y calidad de la luz, la disponibilidad de nutrientes y el estado fisiológico de la célula. Un ejemplo de un microorganismo fotosintético que produce carotenoides como β -caroteno (caroteno) y zeaxantina (xantofila) (ver Figura 3) es *Bacillus licheniformis* (Dichiara, 2019).

Figura 3 Estructura química de β -caroteno (caroteno) (a) y zeaxantina (xantofila) (b)

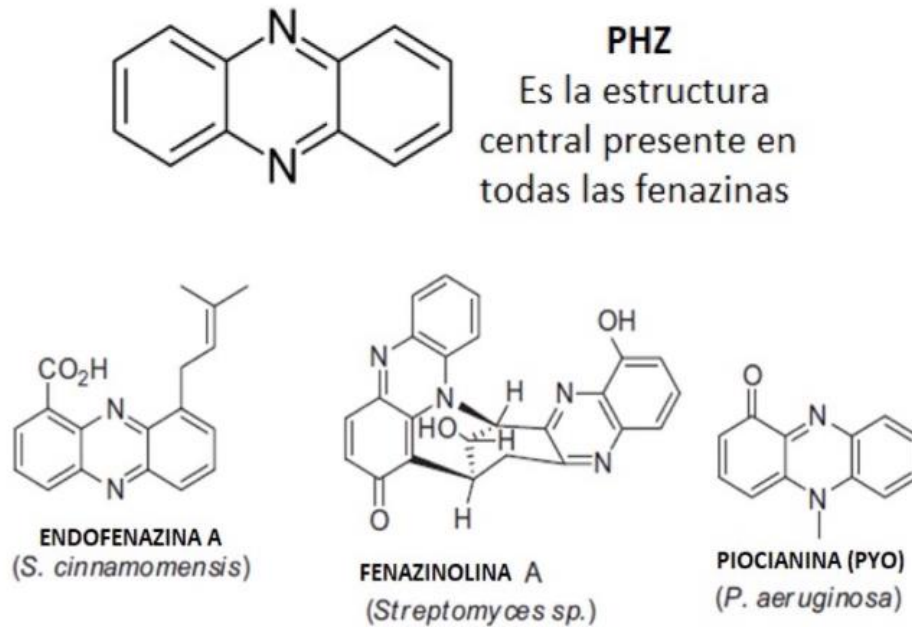


Fuente: (Dichiara, 2019).

Por otro lado, los pigmentos no fotosintéticos son producidos por bacterias las cuales no realizan fotosíntesis como parte de su metabolismo, ejemplo de ellas son las bacterias del azufre y las bacterias del hierro. Estos pigmentos no absorben la luz, sino que cumplen otras funciones, como la protección contra la radiación UV, la regulación de la temperatura celular, la defensa frente a depredadores o competidores, y la supervivencia en ambientes hostiles donde los nutrientes o condiciones esenciales son limitados. Algunos de los pigmentos no fotosintéticos más importantes incluyen: fenazinas, carotenoides, prodigiosina, melaninas, flavinas, etc. (David, 2009).

Los pigmentos tipo fenazinas son producidos por diversas bacterias. Estos son compuestos nitrogenados con propiedades redox, antimicrobianas y señalizadoras. La piocianina y la pioverdina, producidas por *Pseudomonas aeruginosa*, son ejemplos destacados de este tipo de biopigmentos. La piocianina actúa como un potente agente oxidante, contribuyendo a la virulencia bacteriana y a la formación de biopelículas. La pioverdina, por su parte, es un sideróforo que facilita la captación de hierro en ambientes de bajo contenido de este metal. La piorrubina, aunque menos estudiada, se ha relacionado con la protección de las bacterias contra el estrés oxidativo y la formación de biopelículas. Todos estos pigmentos tienen en común una estructura básica, que consiste en tres anillos aromáticos fusionados, formando un sistema de anillo heterocíclico con dos átomos de nitrógeno. Y lo que le confiere a la molécula propiedades específicas, como carga eléctrica, polaridad, capacidad para formar enlaces de hidrógeno y diferentes tonos de color son los grupos funcionales adicionales unidos a este anillo central (Pierson, L. S., & Pierson, E. A. , 2010). Estos grupos pueden ser muy variados tal y como se muestra en la Figura 4. Y al igual que los carotenoides la producción de estos pigmentos está regulado por factores ambientales como la presencia de un metal, otro microorganismo, y la cantidad de recursos disponibles (Gonçalves, T., & Vasconcelos, U. , 2021).

Figura 4 Estructura general de las fenazinas

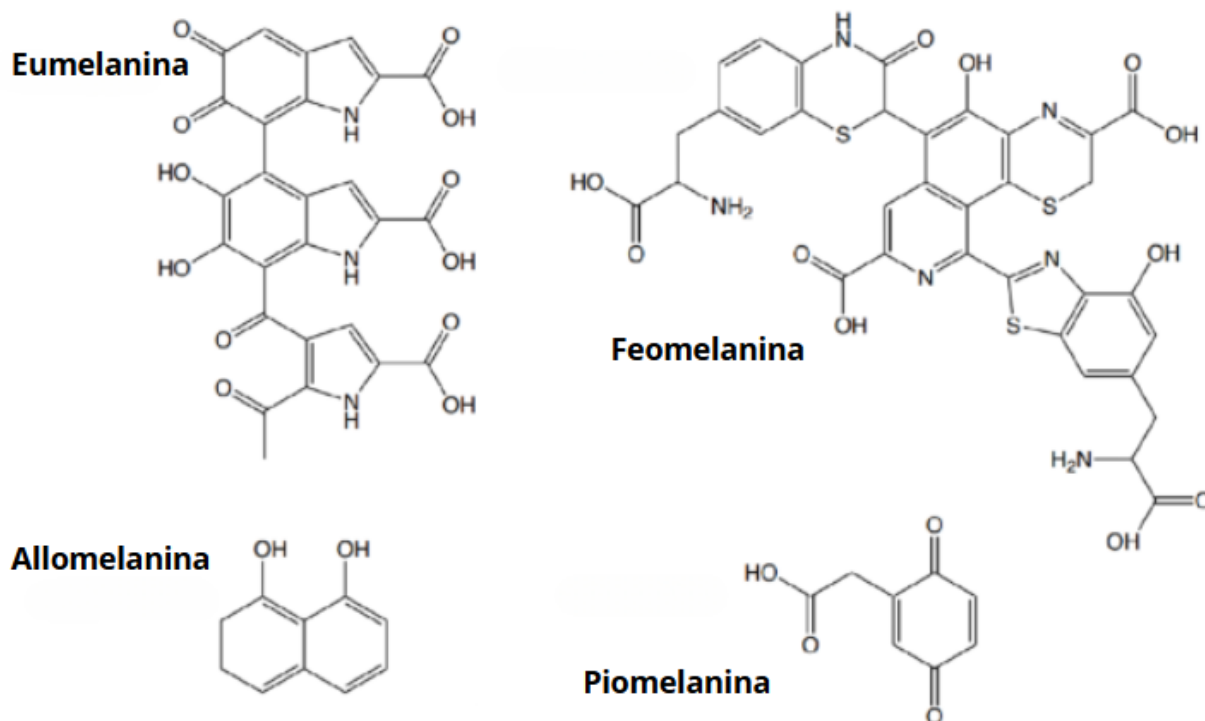


Fuente: (Morales, M. & Escalante, J., 2022).

La Figura 4 (a) ilustra la estructura química central de las fenazinas, su fórmula es $(C_6H_4)_2N_2$. Todas las fenazinas contienen esta estructura central, pero varían en el resto de la molécula ya que pueden tener diferentes grupos funcionales, un ejemplo de ello es la PCA (b) y la piocianina (c).

La prodigiosina es un pigmento rojo decorativo su estructura general es un esqueleto pirrolpirrometeno (ver Figura 5). Es producida principalmente por cepas bacterianas pertenecientes al género *Serratia*, pero también por algunos otros géneros, incluyendo *Streptomyces* y *Vibrio*. Dentro del género *Serratia*, el pigmento generalmente se produce como un factor de virulencia. Sin embargo, también posee muchas actividades biológicas beneficiosas importantes, como actividades inmunosupresoras y ayuda a la célula el microorganismo a sobrevivir en condiciones ambientales adversas, como la exposición a altas temperaturas o a agentes oxidantes (Mnif, S., Jardak, M., Bouizgarne, B., & Aifa, S., 2022).

Figura 6 Estructuras de distintos tipos de melaninas



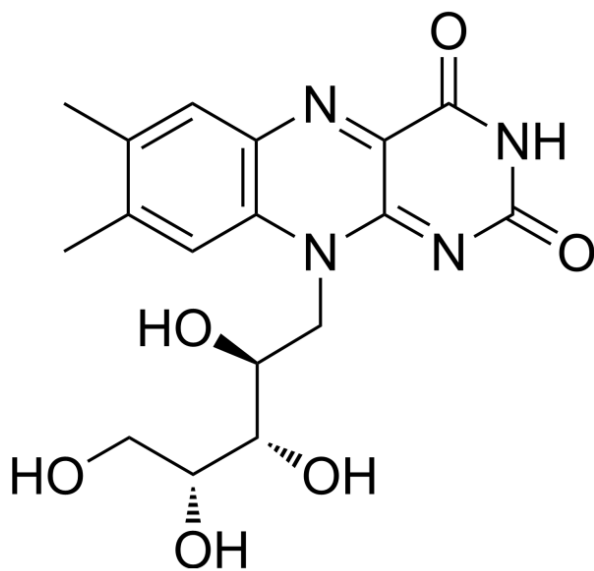
Fuente: (Kordjazi, T. *et.al.* 2024).

La Figura 6 muestra 4 estructuras de melaninas empezando de izquierda a derecha de arriba hacia abajo con Eumelanina, Feomelanina, Allomelaniana y piomelanina.

Por último, la riboflavina, o vitamina B2, es un compuesto heterocíclico de color amarillo intenso que desempeña un papel fundamental en el metabolismo celular. Su capacidad para actuar como cofactor enzimático en diversas reacciones redox la posiciona como una biomolécula de gran relevancia. Químicamente, la riboflavina está compuesta por un anillo isoaloxazina unido a un anillo de D-ribitol tal y como se muestra en la Figura 7. Esta estructura le confiere propiedades redox, que permite a la molécula aceptar y donar electrones en reacciones enzimáticas. Los derivados fosforilados de la riboflavina, el flavín mononucleótido (FMN) y el flavín adenina dinucleótido (FAD), son los cofactores activos que participan en una amplia gama de procesos biológicos, incluyendo: transporte de electrones, catabolismo de nutrientes, protección antioxidante, etc. Diversos microorganismos, como bacterias (e.j., *Bacillus subtilis*, *Ashbya gossypii*), levaduras y hongos filamentosos, son capaces de sintetizar riboflavina, aunque por si solos la cantidad es pequeña, por lo que actualmente se utiliza ingeniería genética para sobre expresar los genes

encargados de la producción de estos. La síntesis de riboflavina está regulada también por factores ambientales como la disponibilidad de hierro, disponibilidad de precursores en la célula, estrés oxidativo y regulación enzimática, ya que sus derivados están presentes en varias reacciones bioquímicas del metabolismo celular (Santos-Mendoza, R., Ramos-Vásquez, E., Iris Zavaleta, A., Zúñiga-Dávila, D., & Velezmoro-Sánchez, C. , 2018).

Figura 7 Estructura de la Riboflavina



Fuente:

(Pinto, J., & Rivlin, R. , 2013).

En general los biopigmentos prestan la ventaja competitiva de contaminar menos los cuerpos de agua con desechos tóxicos al ser biodegradables. Lo cual los hace una alternativa a los pigmentos comerciales que existen en la actualidad además de ello poseen otras ventajas como propiedades antioxidantes, anticancerígenas, antiinflamatorias y antiobesidad, que podría ser explorada para la protección de productos y de la piel. Esto pues los biopigmentos se consideran seguros y pueden ser utilizados tanto en el ámbito de la salud humana como en el ecosistema. Aparte las bacterias son capaces de producir una amplia variedad de colores, ejemplo de ello son los colores amarillos (en *Micrococcus*, *Hymenobactersp.* y *Chryseobacterium sp.*), verde (en *Pseudomonas sp.*) rojo (presente en *Serratia*

marcescens y *Gordonia jacobaea*), rojo-amarillo (en *Kocuria* sp. y *Chruseoacterium artocarp*), azul (en *Corynebacterium insidiosum*, *Erwinia chrysanthemi* y *Vogesella indigofera*) y morado (en *Chromobacterium* sp.) entre otros (Venil, C. K., Dufossé, L., & Renuka Devi, P. , 2020).

C. Fermentación microbiana

La fermentación es un proceso metabólico en el que los microorganismos realizan una oxidación catabólica para producir un compuesto orgánico. Este proceso es esencial para la vida de los microorganismos, ya que les permite obtener energía en ausencia de oxígeno. Durante la fermentación, los microorganismos descomponen moléculas de azúcar u otros sustratos orgánicos y los convierten en productos finales, como alcohol, ácido láctico o dióxido de carbono. Estos productos finales pueden tener aplicaciones industriales, como la producción de cerveza, vino, pan y productos lácteos fermentados. Además, la fermentación también se utiliza en la industria de la biotecnología para producir diferentes productos, como medicamentos y enzimas. A lo largo de la historia, la fermentación ha sido utilizada por diferentes culturas para la conservación de alimentos y la producción de bebidas alcohólicas. Las fermentaciones van a del sustrato, los microorganismos que se van a utilizar y los productos que se desean obtener. Entre las fermentaciones más comunes podemos encontrar la fermentación láctica, acética, butírica, hidrogénica, propiónica, entre otras (McGoeven, P., Zhang, J., Tang, J., Zhang, Z., Hall, G. R., Moreau, R. A., Nunez, A, Buttrym E., Richards, M., Wang, C., Cheng, G., Zhao, Z., & Wang, C., 2004).

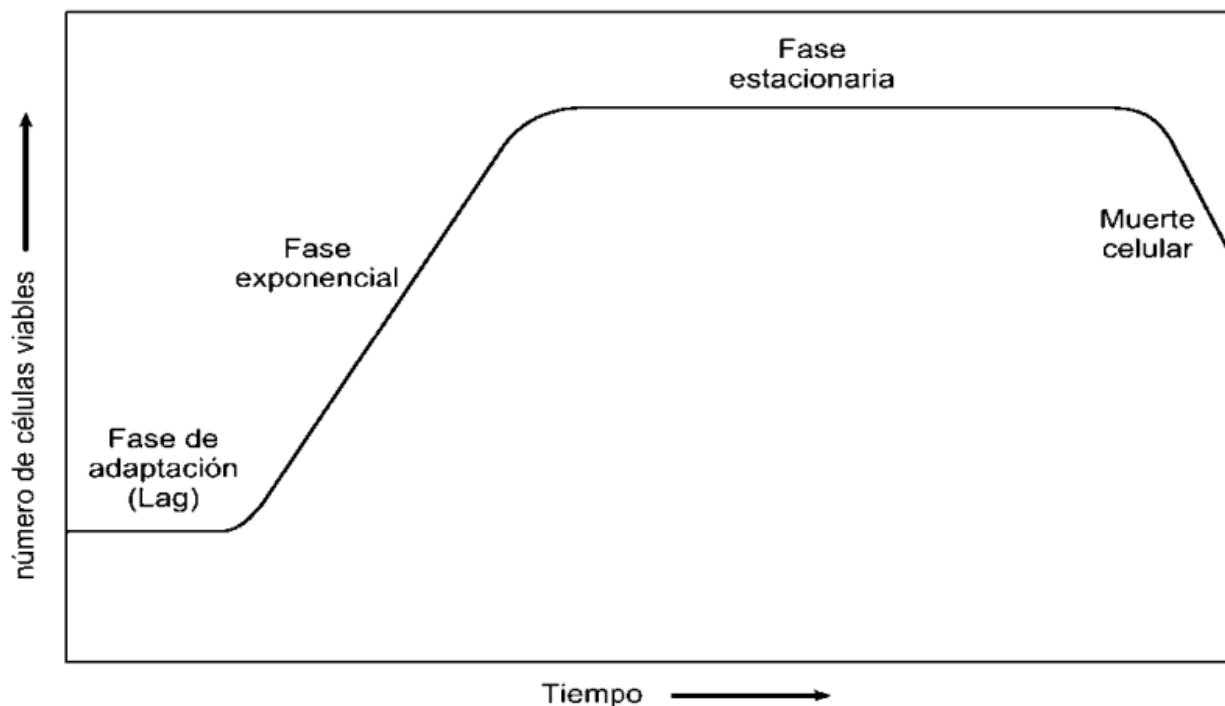
Los microorganismos, como las levaduras y las bacterias, son seres vivos que tienen una gran importancia en la investigación y la industria. El entender su ciclo de vida es un proceso fundamental para su estudio y uso. Es por ello que se ha descrito el proceso de crecimiento microbiano entendiendo este como la vida de una colonia, en cuatro fases las cuales son:

1. Fase Lag: En esta fase, los microorganismos se adaptan a las condiciones del medio de cultivo y comienzan a preparar su división celular.
2. Fase exponencial: En esta fase, los microorganismos se dividen rápidamente, duplicando su número cada cierto tiempo.

3. Fase estacionaria: En esta fase, el crecimiento de los microorganismos se detiene debido a la limitación de nutrientes o la acumulación de productos de desecho.
4. Fase de muerte: En esta fase, los microorganismos mueren a un ritmo mayor que el ritmo de crecimiento.

Las fases de crecimiento microbiano se pueden observar en la curva de crecimiento microbiano en la Figura 1, que es una representación gráfica de la evolución de la población microbiana con el tiempo.

Figura 8 Curva de crecimiento bacteriano



Fuente: (Fernández, 2022).

El conocimiento de las fases de crecimiento microbiano es esencial para el desarrollo de procesos industriales los cuales utilizan microorganismos. Por ejemplo, en la producción de bebidas fermentados, es importante poder controlar la fase de crecimiento exponencial para garantizar que los microorganismos produzcan los productos deseados y en la producción de antibióticos es esencial saber en qué

momento se empieza la producción de estos lo cual ocurre al final de la fase estacionaria y parte de la mitad de la fase de muerte (Fernández, 2022).

D. Agua de coco como medio de fermentación

El uso del agua de coco como medio de cultivo y fermentación se remonta al menos entre finales del siglo XIX y mediados a mediados del siglo XX. En 1942, Picado T. C. realizó un estudio pionero titulado "El agua de coco como medio de cultivo", que sentó las bases para la investigación sobre el uso de sustratos naturales en el cultivo microbiano. Este trabajo fue fundamental para destacar el potencial del agua de coco como medio de crecimiento para diversos microorganismos, lo cual era particularmente significativo en una época en la que la disponibilidad de medios de cultivo sintéticos era limitada.

La composición del agua de coco, que incluye azúcares (3-4%), vitaminas (complejo B y vitamina C), minerales (calcio, fósforo y hierro) y aminoácidos. Esta composición natural proporciona varias ventajas como medio de cultivo, incluyendo un pH adecuado para el crecimiento de bacterias y levaduras entre 4-5.6.

Posteriormente, Sánchez et al. (2005) evaluaron el uso del agua de coco como sustrato para la fermentación de *Saccharomyces cerevisiae* al realizar la evaluación de los parámetros cinéticos para la fermentación de esta. Sus resultados demostraron que el agua de coco puede ser un sustrato viable y eficiente para la fermentación, validando la investigación de Picado. Recientemente un estudio realizado en 2013 por Lee, P.R., Boo, C.X. & Liu, S.Q. evaluó el rendimiento de fermentación de dos cepas probióticas en agua de coco, destacando su potencial como alternativa no láctea para bebidas probióticas. Este estudio demostró que el agua de coco puede servir como un excelente sustrato para el crecimiento y supervivencia de bacterias. Los investigadores descubrieron que el agua de coco, cuando se suplementa con sacarosa y urea, puede apoyar eficazmente la producción de biomasa lo cual lo hace un candidato interesante como medio de cultivo natural.

E. cuantificación de células

La cuantificación precisa y reproducible de células es un paso fundamental en numerosos procesos biotecnológicos, desde el desarrollo de nuevos productos

hasta el control de calidad en la producción a gran escala. La elección del método de cuantificación adecuado depende de diversos factores, como el tipo de célula, el tamaño de la célula, la densidad celular y el objetivo del estudio.

1. Métodos de cuantificación celular

Consiste en cargar una muestra diluida en una cámara de recuento especialmente diseñada, que contiene una cuadrícula de líneas finas grabadas y añadir colorantes como azul de metileno. Al observar la muestra bajo el microscopio, se cuentan las células presentes en una o varias cuadrículas y, mediante cálculos basados en el volumen de cada cuadrícula y las diluciones realizadas, se determina la concentración celular de la muestra original. A pesar de su simplicidad y bajo costo, esta técnica presenta limitaciones como la subjetividad del conteo manual y la dificultad para discriminar células pequeñas o agregadas (Tóth M., Kériné Borsodi E., Felföldi A., Vajna T., Sipos B., & Márialigeti, K., 2013).

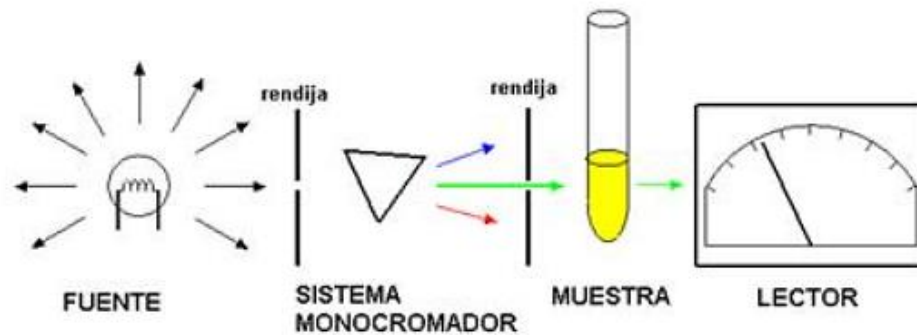
2. **Conteo en placa:** Basado en la capacidad de las células viables de formar colonias en un medio sólido, este método es ampliamente utilizado en microbiología. Se siembra una alícuota de una muestra diluida en una placa de Petri con agar y, tras un período de incubación, se cuentan las colonias formadas. Cada colonia representa una célula viable en la muestra original. El conteo en placa es más sensible que el conteo en cámara de Neubauer y permite estimar la concentración de células viables. Sin embargo, requiere tiempos de incubación más prolongados y no es aplicable a todos los tipos de células. Además, la formación de colonias puede verse afectada por factores como el tipo de medio de cultivo, las condiciones de incubación y la técnica de siembra y no es aplicable a células que no forman colonias (Tóth M., Kériné Borsodi E., Felföldi A., Vajna T., Sipos B., & Márialigeti, K., 2013).

3. **Espectrofotometría:** La espectrofotometría UV-visible es una técnica que permite determinar la concentración de compuestos en una solución. Se basa en la capacidad de las moléculas para absorber radiación electromagnética. La

cantidad de luz absorbida por una molécula depende de su estructura y de las condiciones del medio en el que se encuentra.

La espectrofotometría UV-visible se realiza con un instrumento llamado espectrofotómetro. El espectrofotómetro emite una luz de una longitud de onda determinada y mide la cantidad de luz que es absorbida por la muestra. La cantidad de luz absorbida se representa en un gráfico llamado espectro de absorción. Como se muestra en el diagrama de la Figura 9.

Figura 9 Funcionamiento del espectrofotómetro UV-Vis



El espectro de absorción de una molécula es único para esa molécula. Esto significa que el espectro de absorción se puede utilizar para identificar la molécula. También se puede utilizar para determinar la concentración de la molécula en la muestra.

La medición de la densidad óptica (DO) con el espectrofotómetro a una longitud de onda específica (generalmente 600 nm) proporciona una estimación rápida de la biomasa celular. La espectrofotometría es una técnica analítica que mide la absorción de luz por parte de una muestra a una longitud de onda específica. En microbiología, se utiliza para estimar la concentración de biomasa en un cultivo al medir la turbidez o densidad óptica. Esta técnica es rápida, sencilla y no destructiva, pero presenta limitaciones como la incapacidad de diferenciar entre células vivas y muertas y la necesidad de una curva de calibración específica para cada tipo de célula. La DO se correlaciona

con la concentración celular, pero factores como la presencia de partículas o sustancias coloreadas en el medio pueden interferir en la medición. A pesar de estas limitaciones, la espectrofotometría es una herramienta valiosa para monitorear el crecimiento celular, optimizar condiciones de cultivo y cuantificar biomasa en diversos procesos biológicos (Griffiths, M. J., Garcin, C., van Hille, R. P., & Harrison, S. T. , 2011).

4. Citometría de flujo: Esta técnica permite analizar individualmente un gran número de células, midiendo propiedades como tamaño, complejidad interna y fluorescencia a citometría de flujo es una técnica poderosa que permite analizar un gran número de células de forma individual y rápida. Al hacer pasar una suspensión de células a través de un haz de láser, se pueden medir diversas propiedades celulares como el tamaño, la complejidad interna y la fluorescencia. Esta última característica es especialmente útil, ya que permite identificar y cuantificar moléculas específicas dentro de las células, como proteínas, ácidos nucleicos o marcadores celulares.

El principio fundamental de la citometría de flujo se basa en la marcación de las células con fluorocromos. Estos son colorantes fluorescentes que se unen a moléculas de interés, permitiendo así distinguir diferentes tipos de células o detectar cambios en su estado funcional. Por ejemplo, se pueden utilizar anticuerpos conjugados con fluorocromos para identificar diferentes subtipos de linfocitos, o sondas fluorescentes para evaluar la cantidad de ADN en las células y determinar su fase del ciclo celular.

5. Tinciones vitales: El uso de colorantes como el azul de tripán, que excluye a las células vivas, permite diferenciar entre células viables y no viables. Otros colorantes, como el DAPI o el Hoechst, se unen al ADN y permiten visualizar el núcleo celular, su desventaja es el costo de realizar este análisis a comparación de los dos métodos anteriores (Tóth M., Kériné Borsodi E., Felföldi A., Vajna T., Sipos B., & Márialigeti, K., 2013).
6. Métodos metabólicos: La medición de la actividad metabólica es una técnica fundamental en el estudio de los cultivos celulares y microbianos. Al cuantificar procesos como el consumo de oxígeno o la producción de dióxido

de carbono, se puede obtener una estimación indirecta de la biomasa celular presente en un cultivo. Esta información es útil para evaluar la viabilidad celular, monitorear el crecimiento y determinar la eficiencia de diferentes procesos biotecnológicos.

Existen diversas técnicas para medir la actividad metabólica. Una de las más comunes es la respirometría, que consiste en medir el consumo de oxígeno en un sistema cerrado. Esta técnica se basa en el principio de que las células vivas consumen oxígeno para generar energía a través de la respiración celular. Al medir la disminución de la concentración de oxígeno en un recipiente sellado que contiene una muestra, podemos calcular la tasa respiratoria de las células.

Otra técnica ampliamente utilizada es la medición de la producción de dióxido de carbono. El dióxido de carbono es un producto de desecho de la respiración celular, por lo que su producción está directamente relacionada con la actividad metabólica de las células. Existen diversos sensores y analizadores de gases que permiten medir la concentración de dióxido de carbono en un cultivo, proporcionando así una estimación de la tasa metabólica (Shokrzadeh, M., & Modanloo, M., 2017).

7. Contadores automáticos de células: Los contadores celulares son instrumentos de laboratorio diseñados para cuantificar y analizar células de manera rápida y precisa. Estos equipos utilizan una variedad de tecnologías para determinar el número de células presentes en una muestra, así como otras características celulares como el tamaño y la viabilidad. Al automatizar el proceso de conteo celular, estos instrumentos permiten ahorrar tiempo y obtener resultados más reproducibles en comparación con los métodos manuales.

Una de las tecnologías más comunes utilizadas en los contadores celulares es la impedancia eléctrica. En este método, las células son forzadas a pasar a través de un pequeño orificio, interrumpiendo así un flujo eléctrico. El cambio en la impedancia eléctrica es directamente proporcional al número de células presentes en la muestra. Otra técnica ampliamente utilizada es la dispersión de la luz. En este caso, un haz de luz láser se dirige hacia las células, y la

cantidad de luz dispersada es medida. La cantidad de luz dispersada está relacionada con el tamaño y la complejidad de las células.

Los contadores celulares ofrecen numerosas ventajas en comparación con los métodos tradicionales de conteo celular. Son más rápidos, más precisos y menos propensos a errores humanos. Además, muchos contadores celulares están equipados con software sofisticado que permite analizar los datos obtenidos y generar informes detallados en el momento del análisis *in situ* (Shokrzadeh, M., & Modanloo, M. , 2017).

8. PCR Cuantitativa (qPCR): La qPCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa en Tiempo Real) es una técnica de biología molecular esencial para la detección y cuantificación de ácidos nucleicos, especialmente ADN. Esta técnica se basa en la amplificación exponencial de una secuencia de ADN específica a través de ciclos térmicos repetidos. A diferencia de la PCR convencional, la qPCR permite monitorear la amplificación en tiempo real, lo que proporciona información cuantitativa sobre la cantidad inicial de ADN presente en la muestra.

Una de las aplicaciones más importantes de la qPCR en microbiología es la detección y cuantificación de patógenos. Por ejemplo, la qPCR se utiliza ampliamente para diagnosticar infecciones virales, como el COVID-19 (Lima, A., França, A., Muzny, C. A., Taylor, C. M., & Cerca, N., 2022).

F. Medición de color

Para realizar la medición del color de una manera precisa se utilizan modelos de colores. Un modelo de color es un modelo abstracto matemático que describe la forma en que los colores pueden ser representados por tuplas (listas ordenadas) de números, habiendo típicamente tres o cuatro valores como componentes de un color (P. Nishad and R. Manicka Chezian, , 2013).

1. Pantone

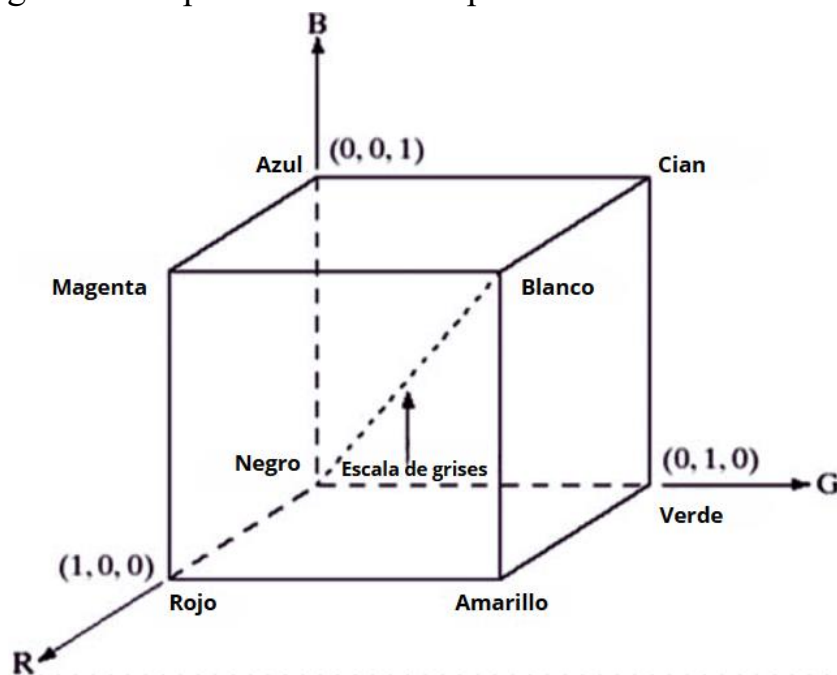
Pantone es un sistema de colores estandarizado que se utiliza en la industria de la impresión, la moda y el diseño gráfico. El sistema Pantone consta de una amplia gama de colores, cada uno con un código único. El sistema Pantone se utiliza para

garantizar que los colores sean consistentes entre diferentes fabricantes y proveedores. Esto es importante para la impresión, la moda y el diseño gráfico, donde la precisión del color es esencial. El sistema Pantone fue desarrollado por la empresa Pantone Inc. y se basa en una serie de colores predefinidos, cada uno identificado por un código único, lo que permite su reproducción exacta en distintos medios y materiales. A diferencia de otros modelos de color como el RGB (usado en pantallas). Pantone se basa en un sistema de mezcla de colores directos, conocidos como *spot colors*, los cuales son formulados con pigmentos específicos para garantizar uniformidad en diferentes superficies y condiciones de producción (Rueda, C., 2021).

2. RGB

El sistema RGB tiene origen en aplicaciones de pantalla CRT y es el espacio de color más utilizado en imágenes digitales. Sin embargo, RGB, presenta alta correlación entre canales, mezcla de datos de cromancia y luminancia que hacen que no sea una buena opción para el análisis de color y menos cuando es en análisis de color en objetos físicos y no digitales (Gonzalez, R.C. and Woods, R.E. , 2008).

Figura 10 Diagrama de representación del espacio de color RGB



Fuente: (Gonzalez, R.C. and Woods, R.E. , 2008).

3. Espacio de Color CIE XYZ

El espacio de color puede describirse como un método para expresar el color de un objeto usando algún tipo de anotación, como números. La Comisión Internacional de l'Eclairage (CIE), una organización sin fines de lucro considerada como la autoridad en la ciencia de luz y color, ha definido espacios de color basado en coordenadas de colores, llamado CIE XYZ de este derivan las variantes CIE $L^*a^*b^*$, y CIE $L^*C^*h^*$, que se crearon para comunicar y expresar el color de un objeto. Estos sistemas permiten a los usuarios evaluar los atributos del color, identificar inconsistencias, y expresar a otros en forma precisa sus descubrimientos en términos numéricos.

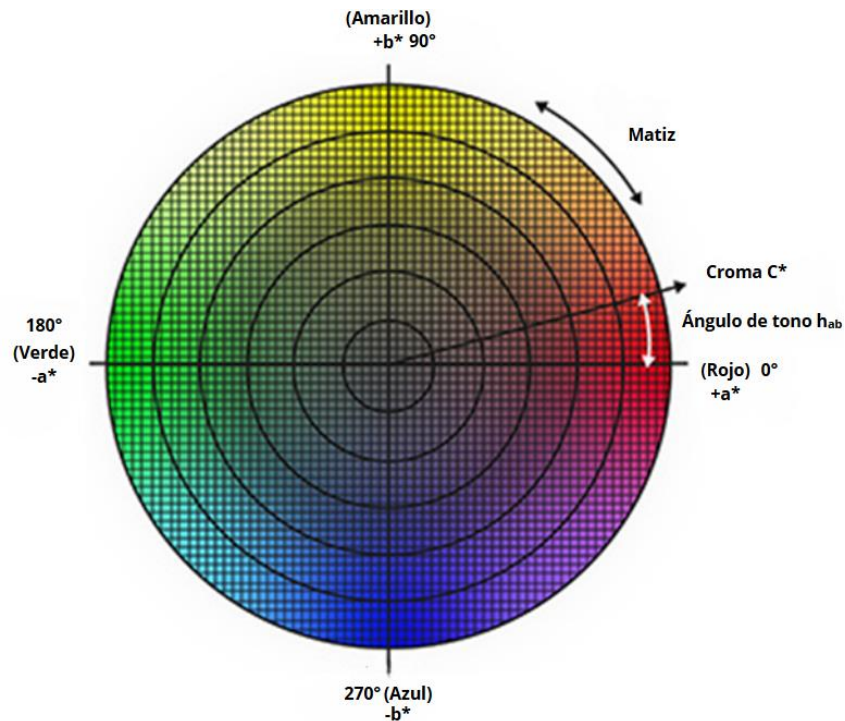
El espacio de color CIE $L^*a^*b^*$, es similar al CIE $L^*C^*h^*$, y difieren en su sistema de coordenadas. Mientras el primero utiliza coordenadas cartesianas y el segundo utiliza coordenadas polares. Pero en general ambas variantes del espacio CIE XYZ es preferido por algunos profesionales de las industrias porque su sistema se correlaciona bien con la forma en que el ser humano percibe el color. Estos sistemas comparten el mismo diagrama que el espacio de color. Y en este espacio de color, L^* indica luminosidad (Konica Minolta Sensing, Inc, 2022).

Para el sistema CIE $L^*C^*h^*$, la C^* representa croma o saturación, y h^* es el ángulo de matiz. El valor de color C^* es la distancia desde el eje de luminosidad (L^*) y comienza a 0 en el centro. El ángulo de matiz comienza en el eje $+a^*$ y es expresado en grados (e.j. 0° es $+a^*$, o rojo, y 90° es $+b^*$, o amarillo).

Mientras el sistema CIE $L^*a^*b^*$, la L^* también representa la luminosidad o diferencia entre luz y oscuridad tomando como referencia el blanco. La a^* , representa las coordenadas rojo/verde (colores opuestos). En este caso un valor positivo de a indica rojo y uno negativo indica verde. Y la b^* , representa las coordenadas amarillo/azul (colores opuestos). En este caso un valor positivo de a indica amarillo y uno negativo indica azul.

Los instrumentos de medición de color facilitan la cuantificación de estos colores. Ellos determinan el color de un objeto dentro del espacio de color y muestran los valores para cada coordenada L^* , C^* , y h^* (Konica Minolta Sensing, Inc, 2022).

Figura 11 Diagrama de representación del espacio de Color CIEL a^*b^* y CIEL $*C^*h^*$



Fuente: (Konica Minolta Sensing, Inc, 2022).

Se muestra en la Figura 11 la representación del espacio del color donde se muestra la distribución de los colores visibles.

G. Aplicación en la industria textil

La aplicación de los biopigmentos en la industria textil está aún en sus primeras etapas, pero está creciendo rápidamente. Esto se debe a la creciente preocupación por la sostenibilidad y la creciente demanda de productos textiles que sean más respetuosos con el medio ambiente. Los biopigmentos se pueden utilizar para el teñido, el estampado o la impresión textil. Para el teñido, los biopigmentos se disuelven en un baño de tinción y se aplican a los tejidos. Para el estampado, los biopigmentos se aplican a los tejidos mediante un proceso de impresión. Para la impresión, los biopigmentos se aplican a los tejidos mediante un proceso de impresión (Guimarães, J. , 2018).

Para ello hay 3 tipos de métodos.

1. Tinción en seco

Este método se utiliza para teñir tejidos de fibras naturales, como el algodón o la lana. Los biopigmentos se aplican al tejido en polvo o en pasta. El tejido se calienta luego para que los biopigmentos se fundan y se fijen al tejido (Guimarães, J. , 2018).

2. Tinción en medio húmedo

Este método se utiliza para teñir tejidos de fibras sintéticas, como el poliéster o el nylon. Los biopigmentos se disuelven en un baño de tintura e inmediatamente después el tejido se sumerge luego en el baño de tintura y se calienta. Los biopigmentos se fijan al tejido al secarse (Guimarães, J. , 2018).

3. Tinción por inmersión

Este es un método más eficaz para obtener colores intensos, aunque guarda similitud con el teñido húmedo este se diferencia en los tiempos. Pues el tejido se sumerge en un baño de tintura que contiene ya los biopigmentos disueltos en este hace al menos un par de minutos. después él tejido se calienta lentamente para que los biopigmentos se fijen al tejido teniendo así más tiempo para esparcirse el color en la tela (Guimarães, J. , 2018).

H. Mecanismos de anclaje de biopigmentos en fibras de algodón

El algodón es una fibra natural compuesta alrededor del 90% por celulosa, un polímero natural formado por largas cadenas de unidades de glucosa. Este tipo de estructura proporciona abundantes sitios de unión para los pigmentos, facilitando una coloración intensa y uniforme debido a los grupos hidroxilo (-OH) presentes en cada unidad de glucosa de la celulosa. La abundancia de grupos hidroxilo en cada unidad de glucosa facilita la formación de enlaces de hidrógeno intermoleculares e intramoleculares, contribuyendo a la resistencia y estabilidad de la estructura celulósica pero también siendo los principales puntos de anclaje para los pigmentos, interactuando a través de diversos mecanismos como puentes de hidrógeno, interacciones electrostáticas o formación de complejos quelantes (Zaghloul, M. Y. M., Zaghloul, M. M. Y., & Zaghloul, M. M. Y. , 2021). Por ejemplo, las fenazinas son un biopigmento que contiene múltiples grupos funcionales, como hidroxilos, aminas y carboxilos, que pueden formar enlaces de hidrógeno con los grupos hidroxilo de la celulosa del algodón. Esta es probablemente la interacción más significativa, proporcionando una fuerte adhesión del pigmento a la fibra (Cézard, C., Farvacques, N., & Sonnet, P. , 2015). También con la estructura anillada de la celulosa, los pigmentos con estructura aromática plana, como la plocianina, pueden interactuar con regiones de la celulosa a través de apilamiento π - π , esta es un tipo de unión de fuerzas de van-der-Waals (vdw) para la unión de estos a la tela (Zhang, 2023). Y así mismo las interacciones de vdw entre la celulosa y los biopigmentos ayudan también a la fijación del color en la tela en el momento de la tinción. Cabe aclarar que la afinidad entre el pigmento y la celulosa varía según la estructura química del pigmento y las condiciones del medio de tinción, incluyendo pH, temperatura y concentración del pigmento (Clark, 2011).

Por otro lado, los componentes no celulósicos del algodón se localizan en las capas externas o dentro de los lúmenes de las fibras y es con estos con los que interactúan los pigmentos menos hidrofílicos. Por ejemplo, los carotenoides pueden interactuar con regiones menos polares de la fibra mediante interacciones de vdw y dipolo-dipolo. Esta interacción es generalmente más débil que las observadas con los biopigmentos hidrofílicos como las antocianinas, betalainas y fenazinas (Kumar, A., Dixit, U., Singh, K., Gupta, S. P., & Beg, M. S. J., 2021).

IV. Metodología

Materiales y equipos:

- 1 Asa bacteriana
- 2 Kit de Isopos con bacterias KWIK-STIK
- 1 Espátula analítica
- Balanza analítica
- 1 Autoclave
- 1 Sistema de baño maría
- 1 Incubadora
- 1 Potenciómetro
- 1 Cámara con luz UV
- 1 Espectrofotómetro
- 3 Celdas de cuarzo
- 1 Secador
- 2 Bandejas de secado
- 1 Termómetro
- 1 Colorímetro Konica Minolta
- 1 Termociclador
- 1 Colorímetro Pocket II HACH
- 1 Unidad de destilación Büchi K-360
- 2 Micropipetas 100uL
- 2 Cajas de puntas de micropipetas 100 uL
- 2 Micropipetas 1000uL
- 1 Caja de puntas de micropipetas 1000 uL
- 1 Rollo de cinta testigo
- 1 Rollo de Parfilm
- 1 Mechero de alcohol
- 1 Encendedor
- 25 Mascarillas KN-95
- 1 Caja de guantes de nitrilo
- 1 Caja de kimwipes
- 1 Rollo de papel aluminio
- 1 Rollo de papel cera

- 1 Rollo de masking tape
- 1 Par de tijeras
- 1 Fuente de luz blanca
- 1 Estufa con agitación
- 1 Agitador magnético
- 12 Viales para el MUSE
- 2 Rejillas de tubos (al menos una metálica)
- 1 Caja de plástico transportadora
- 1 Scruber
- 1 Campana de extracción de gases
- 1 Vortex

Cristalera:

- 54 Placas Petri
- 20 Erlenmeyer
- 36 Tubos de ensayo
- 30 Becipientes 75 mL con tapadera
- 5 Becker 500 mL
- 12 Tubos Büchi 1L
- 1 Probeta 100 mL
- 1 Bureta 50 mL

Reactivos:

- 3g Agar nutritivo
- 16 g Caldo nutritivo
- 500 mL Cloro al 10%
- 2 L Etanol al 70%
- 3 L NaOH (1N)
- 750 mL HCL (1N)
- 3L Agua de coco
- 15 g K₂HPO₄
- 8.5g MgSO₄ 7H₂O
- 10g Extracto de levadura
- 50 g Sacarosa

- 50 g Lactosa
- 27 Pastillas reactiva de Kjeldahl
- 324 mL Ácido Sulfúrico 65%
- 100 mL H₃BO₃
- 100 mL Rojo de metilo
- 18 L Agua desmineralizada
- 18 Viales de digestión de fosfato HACH
- 18 Kits de digestión de fosfato HACH
- 1L Buffer MUSE
- 1620 µL de partículas suspendidas MUSE

A. Activar las bacterias

Materiales y equipo:

- Asa bacteriana
- Kit de Isopos con bacterias KWIK-STIK
- Autoclave
- Incubadora
- Cinta testigo
- Parfilm
- Mechero
- Mascarillas
- Guantes de nitrilo

Cristalería:

- Placas Petri

Reactivos:

- Agar nutritivo
- Cloro al 10%
- Etanol al 70%

Procedimiento:

1. Deje que la bolsa de KWIK-STIK sin abrir se adapte a la temperatura ambiente. Abra la bolsa rasgando a la altura de la muesca y quite la unidad de KWIK-STIK.
2. Retire la porción de la etiqueta de tirar y rasgar y colóquesela a la placa de cultivo principal o al registro de CC. No desarme el dispositivo durante la hidratación.
3. Sobre el borde de la mesa de trabajo o la encimera, agriete la ampolla en la parte superior de KWIK-STIK (justo debajo del menisco del líquido) para liberar el líquido hidratante.
4. Manténgalo vertical y golpee suavemente sobre una superficie dura para facilitar el flujo del líquido por el mango hasta la parte inferior de la unidad que contiene el gránulo.
5. Apriete la parte inferior de la unidad para que el gránulo se disuelva en el líquido hasta lograr una suspensión homogénea.
6. De inmediato, sature el hisopo abundantemente con el material hidratado y transfíralo a la placa con agar de tripocasa de soya previamente autoclaveada e identificada.
7. Inocule la placa de cultivo principal girando con suavidad el hisopo sobre un tercio de la placa.
8. Por medio de un asa esterilizada, haga estrías para facilitar el aislamiento de la colonia.
9. Descarte el KWIK-STIK de forma apropiada para desechos de riesgo biológico.
10. Dejar encubar por 24-48 horas a 35°C.

(Byrns, G., Barham, B., Yang, L., Webster, K., Rutherford, G., Steiner, G., & Scannell, M. , 2021)

B. Preparación de medios

Materiales y equipo:

- Autoclave
- 1 Balanza analítica
- Cinta testigo
- Espátula analítica
- Papel aluminio o cera
- Potenciómetro

Cristalería:

- 20 Erlenmeyer 250 mL
- 2 Beacker 500 mL

Reactivos:

- Azúcar
- Lactosa
- Peptona
- Cloro al 10%
- Etanol al 70%
- Agua de coco
- NaOH
- HCl
- K_2HPO_4
- $MgSO_4 \cdot 7H_2O$
- Extracto de levadura

Procedimiento:

1. Medio líquido de glucosa

- a. Se añade al erlenmeyer 10g/L de glucosa, 3g/L de extracto de levadura, 5g/L de peptona, 1.5 g K_2HPO_4 y 1.5g/L $MgSO_4$.
- b. Añadir agua desionizada.
- c. Ajustar el pH al óptimo de cada bacteria con HCL o NaOH.

- d. Distribuir la solución en las presentaciones necesarias a utilizar.
- e. Autoclavear la solución a 121 °C durante 15 minutos.

(Wan, Z., Zhu, X., Yang, X., Cheung, W., Wen, H., Ma, S., & Lv, J. 2018).

2. Medio líquido de lactosa

- a. Se añade al erlenmeyer 10 g/L de lactosa 3g/L de extracto de levadura, 5g/L de peptona, 1.5 g K₂HPO₄ y 1.5g/L MgSO₄
- b. Añadir agua desionizada
- c. Ajustar el pH al óptimo de cada bacteria con HCL o NaOH
- d. Distribuir la solución en las presentaciones necesarias a utilizar
- e. Autoclavear la solución a 121 °C durante 15 minutos

(Wan, Z., Zhu, X., Yang, X., Cheung, W., Wen, H., Ma, S., & Lv, J. , 2018).

3. Medio líquido agua de coco

- a. En un erlenmeyer o beacker
- b. Añadir al recipiente ,0.5 g/l g K₂HPO₄, 0.5g/L MgSO₄, 2.5g/L Extracto de levadura y 2.5 g/L de peptona
- c. Añadir 1L de agua de coco fresca y agitar.
- d. Distribuir en las presentaciones a utilizar.
- e. Esterilizar en autoclave a 121 °C durante 15 minutos.
- f. Filtrar el medio y guardarlo a 4°C hasta cuando se vaya a usar.

(Sánchez, 2005).

C. Crecimiento de cepas en medios preparados

Materiales y equipo:

- 1 Asa bacteriana
- Incubadora
- Shakers
- Parfilm
- Mechero
- Mascarillas
- Guantes de nitrilo

- Micropipetas 1000 μ L
- Puntas para micropipetas 1000 μ L

Cristalería:

- 1 Beacker 500 mL
- 36 tubos de ensayo

Reactivos:

- Cloro al 10%
- Etanol al 70%

Procedimiento:

1. Esterilizar el asa bacteriana a utilizar.
2. Seleccionar una colonia de la sepa de las placas con triptocasa de soya y sumergir está en el tubo de ensayo con el medio preparado.
3. Esterilizar nuevamente el asa.
4. Dejar encubando por 72 horas en incubadora.
5. Repetir este proceso en cuadruplicado con todas las cepas.
6. Después de las 72 horas observar el crecimiento. Si hubiese crecimiento trasladar 1mL del medio con las bacterias en los tubos de ensayo a un Erlenmeyer de 250 mL.
7. Colocar estos en la incubadora y dejar crecer a 35°C por una semana.

D. Viabilidad de células

Equipos y materiales

- Muse
- Vortex
- Gradilla
- Micropipeta 100 μ L
- Puntas de micropipetas 100 μ L

Cristalería

N/a

Reactivos

- Medio de cultivo líquido
- Agua destilada
- Cloro al 10%
- Partículas MUSE

Procedimiento

1. Encender el equipo MUSE con el botón de encendido.
2. Ingresar su usuario
3. Realizar una limpieza total del sistema cargando de primero in vial de Cloro y luego un vial de agua cuando el equipo lo indique.
4. Preparar los viales con 380 μ L de muestra de medio de cultivo llenando cada uno con la ayuda de la micropipeta. (Usar una punta por muestra y después descartar estas).
5. Añadir 20 μ L de Partículas MUSE a cada vial.
6. Agitar en el vortex cada muestra por 20 s.
7. Cargar el vial al equipo y comenzar el análisis.
8. Imprimir los datos de viabilidad en porcentajes y cantidad de células viables.

E. Cuantificación de Nitrógeno por método de Kjeldahl

Materiales y equipo:

- Unidad destiladora Büchi
- Balanza analítica
- 1 Micropipeta 1000 μ L
- Puntas de micropipetas 1000 μ L
- Campana de extracción de gases
- Scruber

Cristalería:

- 12 Tubos Büchi 1L
- 1 Bureta 25 mL
- 1 Becker
- 12 Erlenmeyer

Reactivos:

- HCL (1N)
- NaOH al 40%
- Pastillas Kjeldahl(catalizador)
- H₃BO₃
- Rojo de metilo

Procedimiento

1. Se pesan 0.25 gramos de muestra a analizar sobre el papel encerado, se introduce el papel encerado en la cristalería especial (tubo de vidrio) de equipo. Agregando la mitad de pastilla reactiva de Kjeldahl (catalizador).
2. Luego se agregan 6 mililitros de ácido sulfúrico al 65%.
3. Se enciende el equipo elevando la temperatura a 600°C.
4. Se enciende la campana de extracción de gases para evitar contaminación dentro del laboratorio, este proceso dura 2 horas (1 hora 45 minutos en proceso de incineración, 15 minutos de enfriamiento).
5. Al finalizar este proceso se enciende la unidad de destilación, debe de llegar a temperatura adecuada para su uso, previo al uso debe de realizarse un lavado del equipo, esto se realiza únicamente presionando el botón de Start.
6. Al llegar a las condiciones de trabajo se agregan a cada uno de los Erlenmeyer 10 mililitros de ácido bórico con rojo de metilo, para colocar en la unidad de destilación.
7. Los tubos del equipo deben de colocarse en el equipo de destilación, se acciona el equipo (presionar botón de Reagent) el cual agrega 40 mililitros de hidróxido de sodio al 40%, al agregar el hidróxido el equipo se detendrá, para lo cual ahora se debe de presionar el botón de Start, el cual agregará el agua destilada 20 mililitros aproximadamente.
8. Titular con HCL (1N) y anotar el volumen.
9. Realizar los cálculos para encontrar la cantidad de nitrógeno total en la muestra.

F. Cuantificación de Fosfato

Materiales y equipo

- Colorímetro II HACH
- Termociclador
- 1 Micropipeta 1000uL
- Puntas de micropipetas 1000uL

Cristalería

- 9 Viales de análisis de fósforo
- Reactivo
- Kit de análisis de fosfatos:
- Reactivo de molibdovanadato
- Almohadilla de polvo de persulfato de potasio
- Hidróxido de sodio, 1,54 N
- Viales de prueba de fósforo total
- Agua desionizada
- 2 mL de medio de cultivo con bacterias

Procedimiento:

Procedimiento para medir fósforo total en agua usando DRB200:

Preparación:

1. Encienda el reactor DRB200. Precaliéntelo a 150 °C.
2. Inicie el programa 542 P Total HR TNT.

Preparación de muestras y blanco:

3. Prepare el blanco: Agregue 5.0 mL de agua desionizada a un vial de prueba de fósforo total.
4. Prepare la muestra: Agregue 5.0 mL de la muestra de agua a un vial de prueba de fósforo total.
5. Agregue el contenido de un sobre de polvo de persulfato de potasio a cada vial de digestión:
6. Cierre el vial con su tapa. Agite para disolver el polvo.
7. Inserte el vial en el reactor. Cierre el reactor.
8. Inicie el temporizador del instrumento. Se inicia un tiempo de reacción de 30 minutos.

Enfriamiento y desarrollo del color:

9. Una vez que finalice el temporizador, retire con cuidado los viales calientes del reactor. Coloque los viales en un soporte para tubos de ensayo. Deje que los viales se enfríen a temperatura ambiente.
10. Agregue 2 mL de solución estándar de hidróxido de sodio 1.54 N a cada vial.
11. Cierre el vial con su tapa. Invierta para mezclar.
12. Use un gotero de polietileno para agregar 0.5 mL de reactivo de molibdovanadato a cada vial.
13. Cierre el vial con su tapa. Invierta para mezclar.

Medición:

14. Inicie el temporizador del instrumento. Se inicia un tiempo de reacción de 7 minutos. La muestra se debe medir entre siete y nueve minutos después de la adición del reactivo de molibdovanadato.
15. Limpiar el vial.
16. Insertar el vial en el colorímetro HACH.
17. Presione CERO. La pantalla muestra 0.0 mg/L PO_4^{3-} .
18. Limpiar el vial.
19. Insertar el vial en el colorímetro HACH.
20. Presione LECTURA. Los resultados se muestran en mg/L PO_4^{3-} .

G. Tinción**Materiales y equipo:**

- Tijeras
- Regla
- 2 Yardas de fibra textil
- Autoclave
- Secador
- Bandejas de secado

Procedimiento:

1. Cortar la tela en Cuadros o la forma deseada. Pero que la relación entre peso de fibra y peso de la solución colorante sea de 1:10.

2. Se lleva a cabo el teñido a 40°C por 30 min, sin necesidad de agregar auxiliares químicos.
Con un gradiente: 1.5°C/min.
3. Se aumenta la temperatura a 95°C por 20 min para desactivar todo el contenido microbiano.
4. Se realizan dos lavados a 60°C por 10 min.
5. Se realiza el secado de 2 a 3 horas en un secador con flujo de aire caliente, o en cámaras de rayos infrarrojos.

(Albini_next,2023).

H. Análisis colorimétrico

Materiales y Equipo:

- Colorímetro
- Tela teñida
- Tela sin teñir
- Superficie lisa y reflectante
- Fuente de luz uniforme

Procedimiento

1. Preparar la tela asegurándose de que la tela esté seca y libre de suciedad o grasa.
2. Colocar la tela teñida sobre una superficie lisa y reflectante.
3. Ubicar la fuente de luz de modo que ilumine uniformemente la tela teñida.
4. Encender el colorímetro y seleccionar el modo de medición de color.
5. Colocar el colorímetro frente a la tela teñida, a una distancia de aproximadamente 15 centímetros.
6. Esperar a que el colorímetro se estabilice.
7. Leer los valores de luminosidad y croma en la pantalla del colorímetro.

(ColorMunki, 2014)

VI. Definición de variables

Listado de las variables a medir durante el trabajo de graduación:

- Concentración de nitrógeno
- Concentración de fósforo
- Concentración de sustrato
- Luminosidad
- Cromas a y b

VII. Resultados

A. Formulación de medios de cultivo líquidos usados en el crecimiento de las cepas bacterianas para la producción de pigmentos.

Cuadro 1 Formulación de medios de cultivo propios

Ingredientes	Formulaciones		
	α	β	γ
Sacarosa ($\pm 5 \times 10^{-4}$ g/l)	10	0	0
Lactosa ($\pm 5 \times 10^{-4}$ g/l)	0	10	0
Peptona ($\pm 5 \times 10^{-4}$ g/l)	5	5	2.5
Extracto de levadura ($\pm 5 \times 10^{-4}$ g/l)	3	3	2.5
KH_2PO_4 ($\pm 5 \times 10^{-4}$ g/l)	1.5	1.5	0.5
MgSO_4 ($\pm 5 \times 10^{-4}$ g/l)	1.5	1.5	0.5
Agua destilada ($\pm 5 \times 10^{-4}$ g/l)	1	1	0
Agua de coco ($\pm 5 \times 10^{-4}$ g/l)	0	0	1

Fuente: Elaboración propia.

En el Cuadro 1 se muestran las concentraciones de los diferentes reactivos en los 3 medios formulados.

Figura 12. Imagen de medios de cultivos

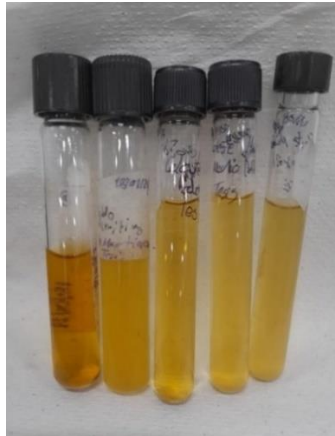


Fuente: Elaboración propia.

En la imagen se observan tubos de ensayo con los medios de cultivo de izquierda a derecha: medio nutritivo comercial, medio γ , medio β , y medio α .

B. Comparación del crecimiento de producción de pigmentos en diferentes medios de cultivo, para identificar el de mayor rendimiento.

Figura 13 Imagen de comparación de crecimiento de la cepa P.A. en diferentes medios de cultivo



Fuente: Elaboración propia.

En la imagen se observan tubos de ensayo de izquierda a derecha: medio nutritivo sin inocular, medio de cultivo inoculado con un UFC y los medios α , β , γ inoculados con un UFC.

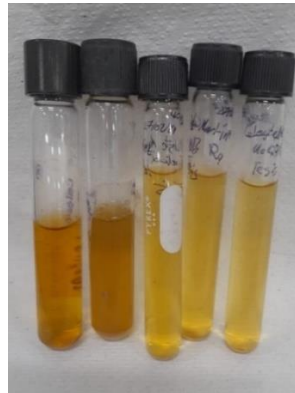
Figura 14 Imagen de comparación de crecimiento de la cepa P.B. en diferentes medios de cultivo



Fuente: Elaboración propia.

En la imagen se observan tubos de ensayo de izquierda a derecha: medio nutritivo sin inocular, medio de cultivo inoculado con un UFC y los medios α , β , γ inoculados con un UFC.

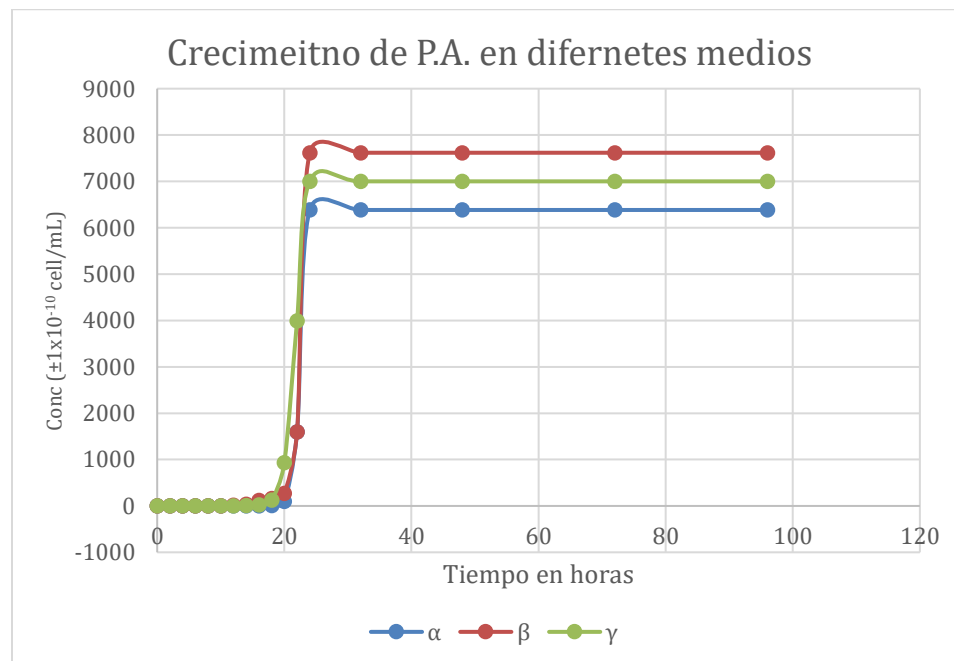
Figura 15 Imagen de comparación de crecimiento de la cepa R.a. en diferentes medios de cultivo



Fuente: Elaboración propia.

En la imagen se observan tubos de ensayo de izquierda a derecha: medio nutritivo sin inocular, medio de cultivo inoculado con un UFC y los medios α , β , γ inoculados con un UFC.

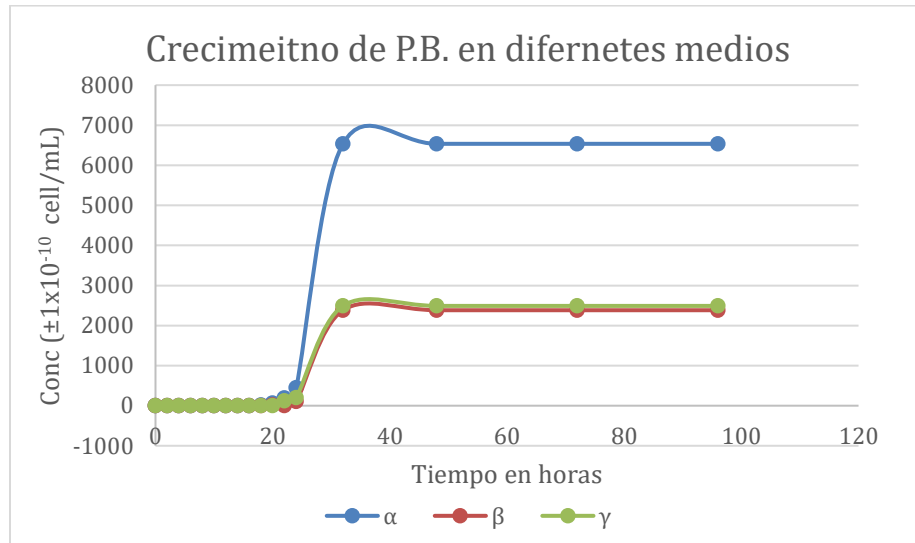
Figura 16 Gráfica de crecimiento de la cepa P.A. en los diferentes medios de cultivo



Fuente: Elaboración propia.

En la gráfica se puede apreciar el crecimiento de P.A. en los 3 medios de cultivo, estos oscilan entre 6000y 8000 UFC/mL.

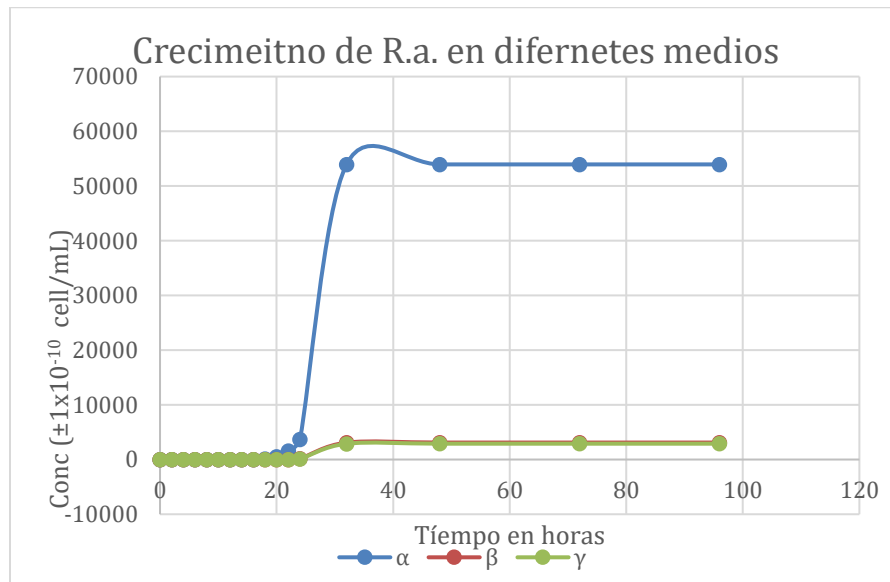
Figura 17 Gráfica de crecimiento de la cepa P.B. en los diferentes medios de cultivo



Fuente: Elaboración propia.

En la gráfica se puede apreciar el crecimiento de P.B. en los 3 medios de cultivo, estos oscilan entre 2000y 7000 UFC/mL.

Figura 18 Gráfica de crecimiento de la cepa R.a. en los diferentes medios de cultivo







Fuente: Elaboración propia.

En la gráfica se puede apreciar el crecimiento de R.a. en los 3 medios de cultivo, estos oscilan entre 5000y 60000 UFC/mL.

C. Variación de Nitrógeno y Fósforo

Cuadro 2 Análisis colorimétrico de los medios de cultivos preparados

Medio	Color	Pantone		Cie L*a*b		
		Código	Nombre	L (± 0.05)	a (± 0.05)	b (± 0.05)
caldo nutritivo		18-1163 TCX	Pumpkin Spice	41.00	22.00	50.00
α		16-1103 TCX	Pure Cashmere	66.00	0.00	9.00
β		16-1212 TCX	Nomad	60.00	0.00	17.00
γ		16-0639 TCX	Golden Olive	59.00	3.00	40.00

Fuente: Elaboración propia.

El cuadro presenta el código y nombre Pantone, los parámetros del espacio CIEL*a*b para el caldo nutritivo y los 3 medios de cultivo originales formulados como se indica en el Cuadro 1.

Figura 19 Imagen de varios medios de cultivo sin inocular



Fuente: Elaboración propia.

En la imagen se observan los recipientes de izquierda a derecha: medio β con 1, 1.5 y 2 concentración original de fósforo y la concentración inicial de nitrógeno, con 1, 1.5 y 2 concentración original de fósforo y la concentración inicial de nitrógeno 0.5, y con 1, 1.5 y 2 concentración original de fósforo y la concentración inicial de nitrógeno 0.25, esto referido a los datos del Cuadro 1.

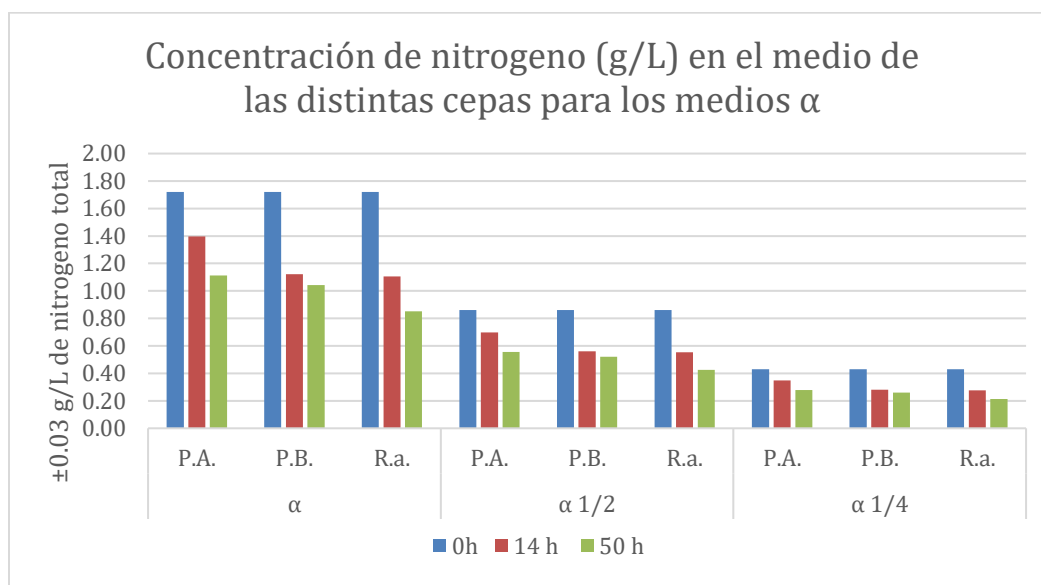
Cuadro 3 Análisis colorimétrico de los medios de cultivos α , β & γ con modificaciones en sus concentraciones de nitrógeno antes de la inoculación.

Medio	Color	Pantone		Cie L*a*b		
		Código	Nombre	L (± 0.05)	a (± 0.05)	b (± 0.05)
α N		17-1022 TCX	Kelp	56.00	1.00	31.00
α 1/2 N		16-1109 TCX	Greige	57.00	0.00	22.00
α 1/4 N		16-4803 TCX	Debonair Gray	58.00	0.00	11.00
β N		18-0830 TCX	Butternut	49.00	5.00	47.00
β 1/2 N		18-0724 TCX	Gothic Olive	50.00	3.00	34.00
β 1/4 N		18-0617 TCX	Covert Green	54.00	0.00	21.00
γ N		17-0935 TCX	Dull Gold	49.00	3.00	34.00
γ 1/2 N		18-0617 TCX	Covert Green	54.00	0.00	19.00
γ 1/4 N		17-5800 TCX	Hematite	56.00	0.00	7.00

Fuente: Elaboración propia.

El Cuadro muestra el color de los diferentes medios de cultivo antes de ser inoculados, con las variaciones en su concentración de nitrógeno referido al Cuadro 1. Así como su código y nombre Pantone, y los valores Cie L*a*b de estos.

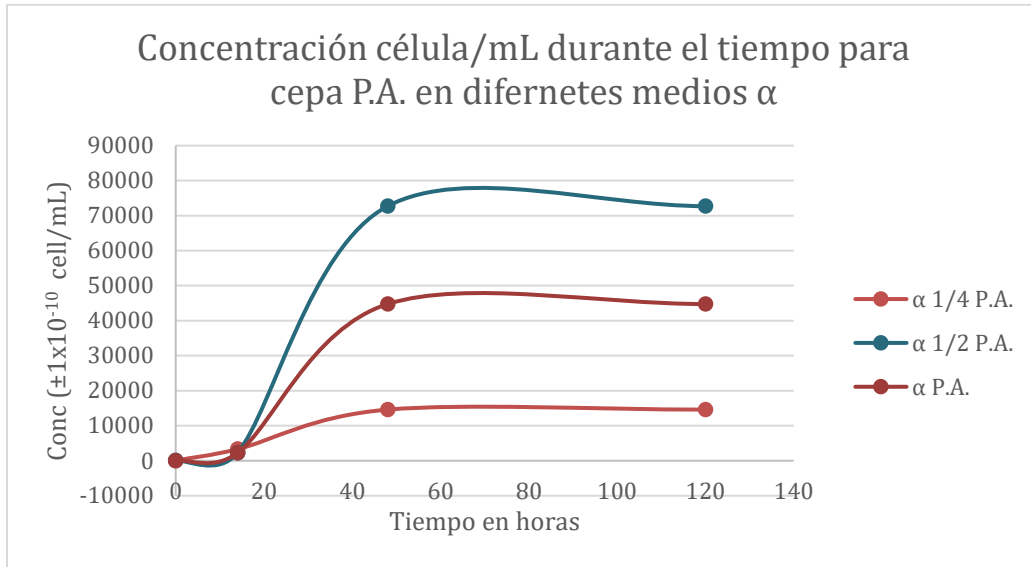
Figura 20 Gráfica de concentración de crecimiento de las distintas cepas en el medio α de cultivo modificando la concentración inicial de nitrógeno



Fuente: Elaboración propia.

En la imagen se observa la concentración de nitrógeno para 0h, 14h & 50h para el medio α , medio α con 0.5 de la concentración inicial de nitrógeno y medio α con 0.25 de la concentración inicial de nitrógeno indicada en el Cuadro 1.

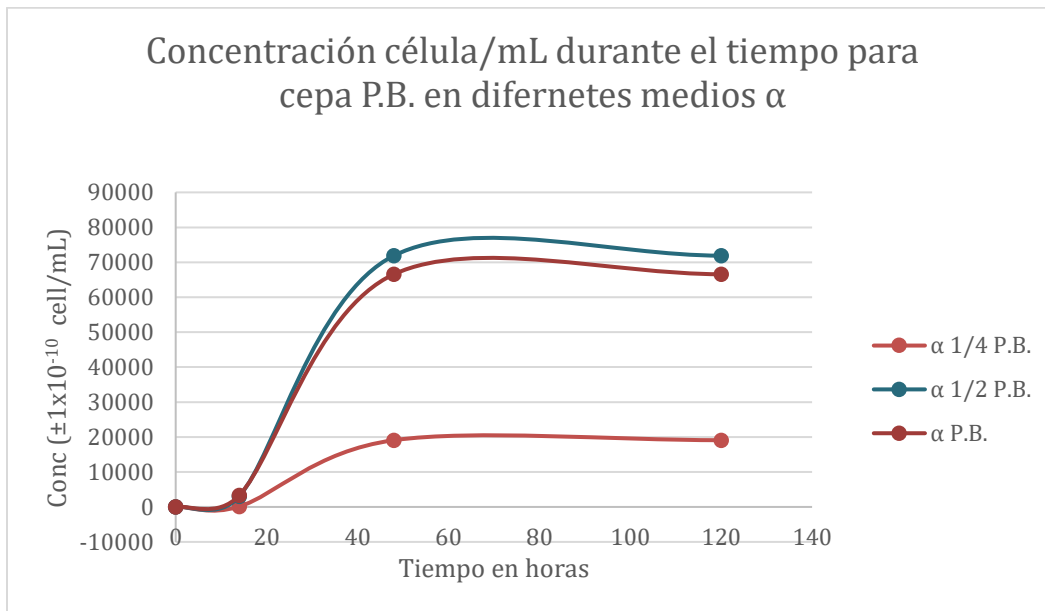
Figura 21 Gráfica de concentración de crecimiento de la cepa P.A. en el medio α de cultivo modificando la concentración inicial de nitrógeno



Fuente: Elaboración propia.

En la gráfica se observa la concentración de células viables por mL de la cepa P.A. durante 120 horas en los medios α .

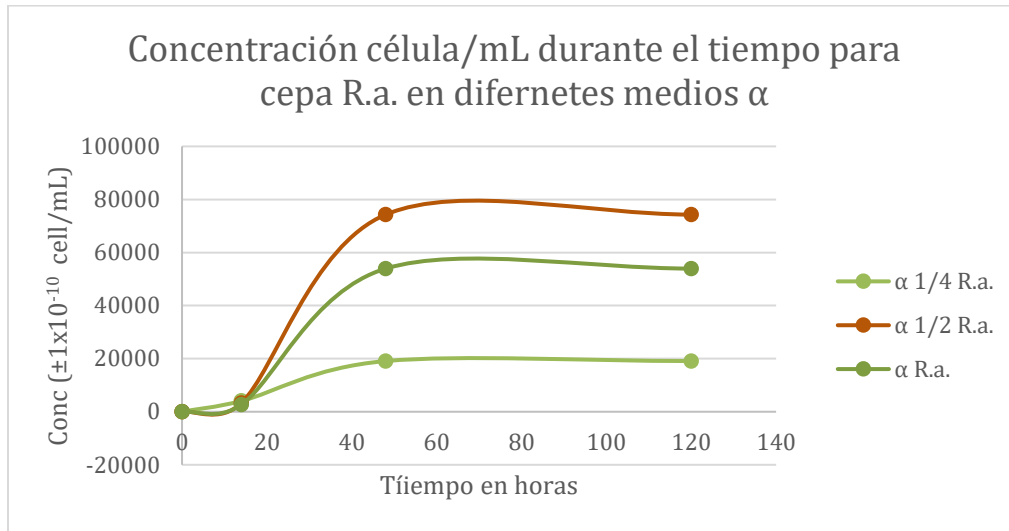
Figura 22 Gráfica de concentración de crecimiento de la cepa P.B. en el medio α de cultivo modificando la concentración inicial de nitrógeno



Fuente: Elaboración propia.

En la gráfica se observa la concentración de células viables por mL de la cepa P.B. durante 120 horas en los medios α .

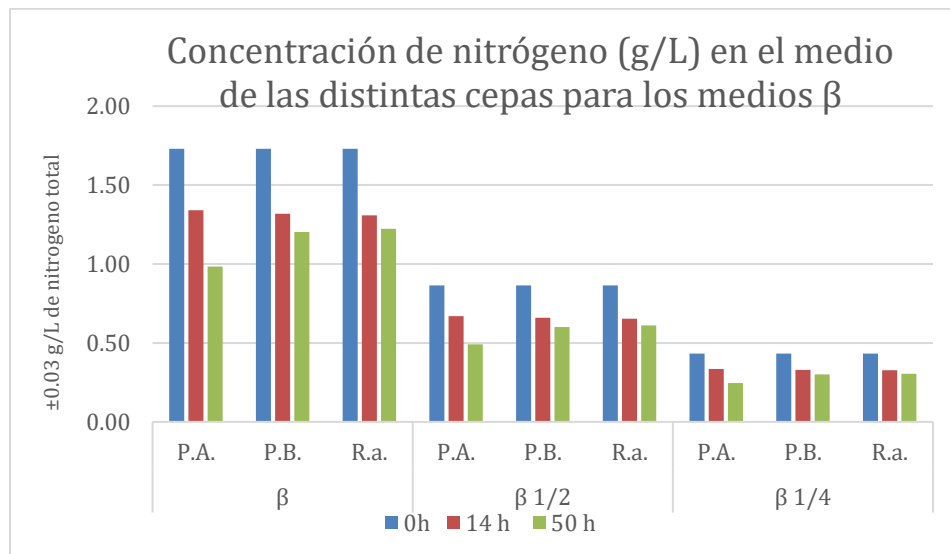
Figura 23 Gráfica de concentración de crecimiento de la cepa R.a. en el medio α de cultivo modificando la concentración inicial de nitrógeno



Fuente: Elaboración propia.

En la gráfica se observa la concentración de células viables por mL de la cepa R.a. durante 120 horas en los medios α .

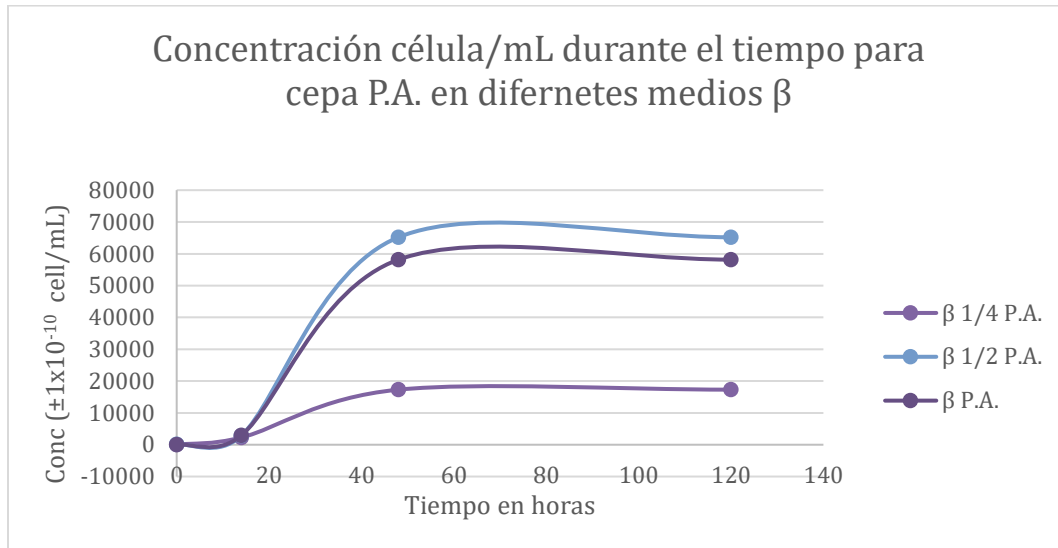
Figura 24 Gráfica de concentración de crecimiento de las distintas cepas en el medio β modificando la concentración inicial de nitrógeno



Fuente: Elaboración propia.

En la imagen se observa la concentración de nitrógeno para 0h, 14h & 50h para el medio β , medio β con 0.5 de la concentración inicial de nitrógeno y medio β con 0.25 de la concentración inicial de nitrógeno, indicados en el Cuadro 1.

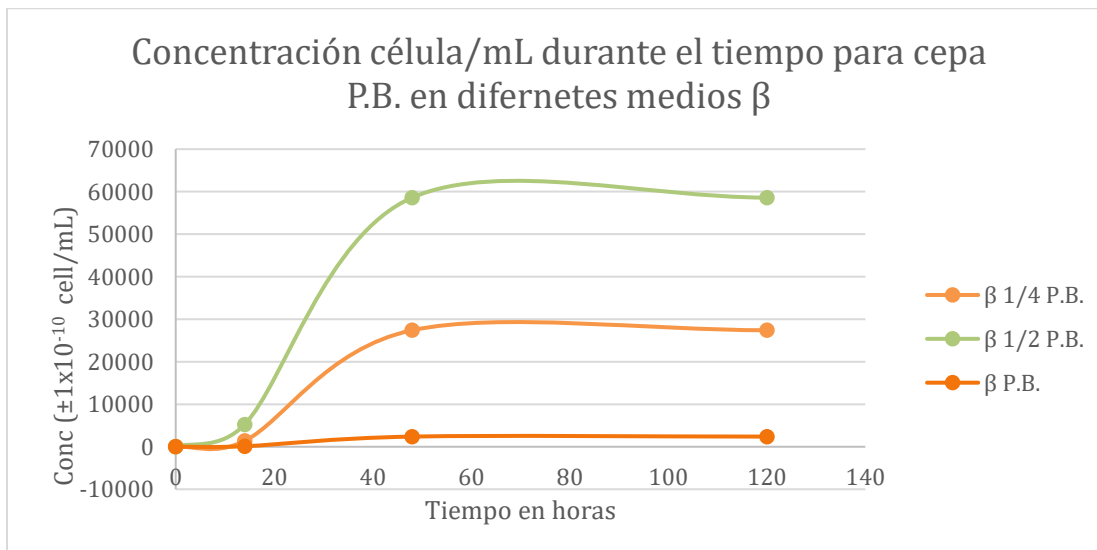
Figura 25 Gráfica de concentración de crecimiento de la cepa P.A. en el medio β de cultivo modificando la concentración inicial de nitrógeno



Fuente: Elaboración propia.

En la gráfica se observa la concentración de células viables por mL de la cepa P.A. durante 120 horas en los medios β .

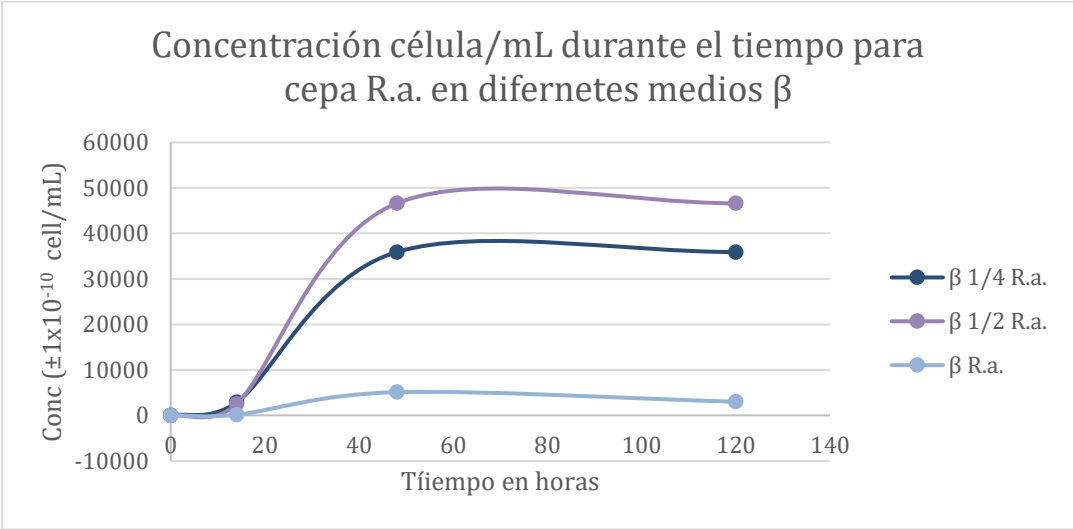
Figura 26 Gráfica de concentración de crecimiento de la cepa P.B. en el medio β de cultivo modificando la concentración inicial de nitrógeno



Fuente: Elaboración propia.

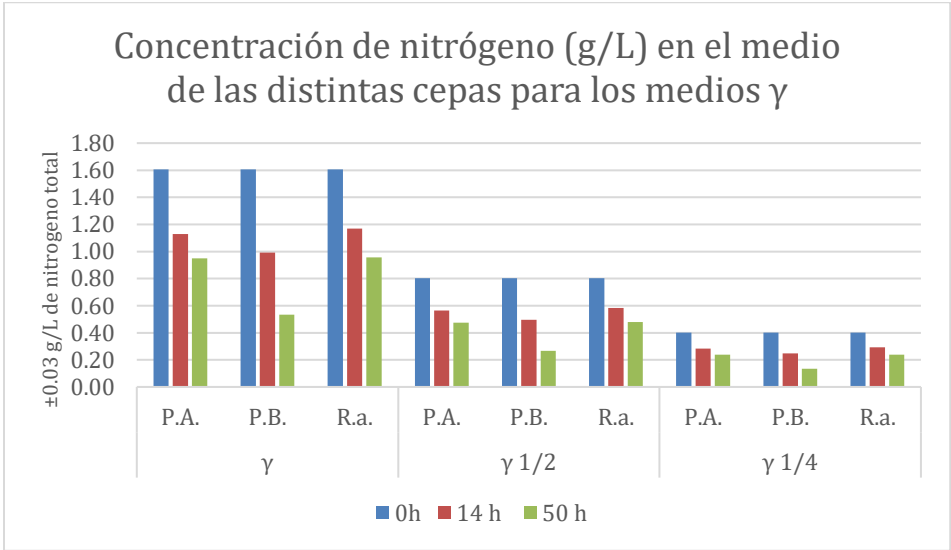
En la gráfica se observa la concentración de células viables por mL de la cepa P.A. durante 120 horas en los medios β .

Figura 27 Gráfica de concentración de crecimiento de la cepa R.a. en el medio β de cultivo modificando la concentración inicial de nitrógeno



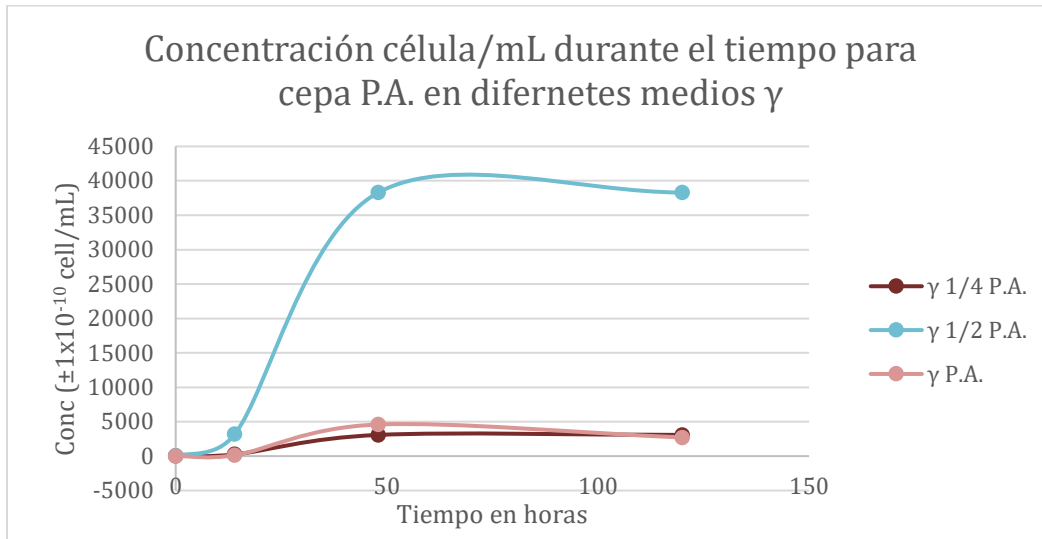
Fuente: Elaboración propia.
 En la gráfica se observa la concentración de células viables por mL de la cepa P.A. durante 120 horas en los medios β .

Figura 28 Gráfica de concentración de crecimiento de las distintas cepas en el medio γ de cultivo modificando la concentración inicial de nitrógeno



Fuente: Elaboración propia.
 En la imagen se observa la concentración de nitrógeno para 0h, 14h & 50h para el medio γ , medio γ con 0.5 de la concentración inicial de nitrógeno y medio γ con 0.25 de la concentración inicial de nitrógeno, referido al Cuadro 1.

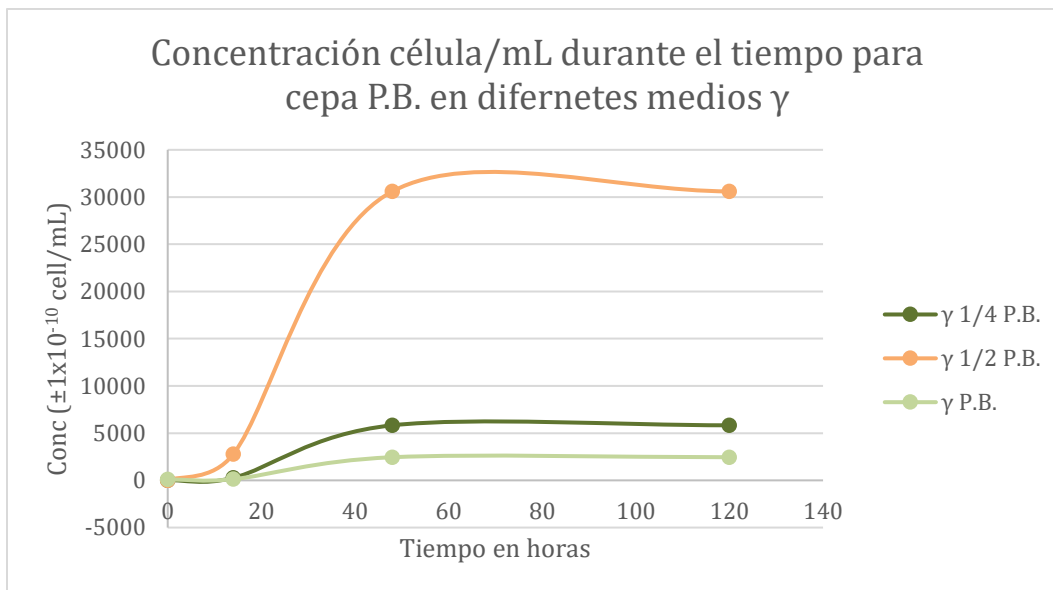
Figura 29 Gráfica de concentración de crecimiento de la cepa P.A. en el medio γ de cultivo modificando la concentración inicial de nitrógeno



Fuente: Elaboración propia.

En la gráfica se observa la concentración de células viables por mL de la cepa P.A. durante 120 horas en los medios γ .

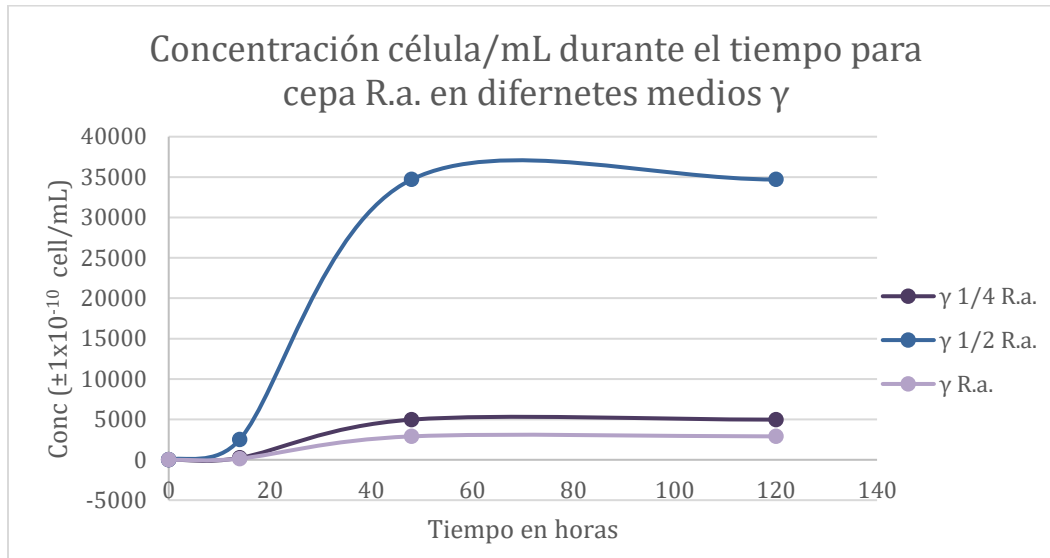
Figura 30 Gráfica de concentración de crecimiento de la cepa P.B. en el medio γ de cultivo modificando la concentración inicial de nitrógeno



Fuente: Elaboración propia.

En la gráfica se observa la concentración de células viables por mL de la cepa P.B. durante 120 horas en los medios γ

Figura 31 Gráfica de concentración de crecimiento de la cepa R.a. en el medio γ de cultivo modificando la concentración inicial de nitrógeno



Fuente: Elaboración propia.

En la gráfica se observa la concentración de células viables por mL de la cepa R.a. durante 120 horas en los medios γ










Cuadro 4 Análisis colorimétrico de los medios de cultivos con las modificaciones en la concentración de nitrógeno para la cepa P.A. a las 52 h

Medio	Color	Pantone		Cie L*a*b		
		Código	Nombre	L (± 0.05)	a (± 0.05)	b (± 0.05)
α N		17-0929TCX	Fenel Seed	56.01	0.02	29.00
α 1/2 N		17-0636TCX	Geen Moos	51.00	-1.00	25.97
α 1/4 N		17-0625TCX	Boa	54.00	-2.02	20.00
β N		18-0940TCX	Golden Brown	47.00	6.02	40.98
β 1/2 N		17-0636TCX	Geen Moss	50.95	1.00	27.00
β 1/4 N		18-0617TCX	Covert Green	50.00	0.02	14.00
γ N		18-0830TCX	Butternut	45.00	4.00	30.01
γ 1/2 N		17-0517TCX	Dusky Green	47.03	0.02	17.04
γ 1/4 N		17-5800TCX	Hematite	53.00	-0.95	10.00

Fuente: Elaboración propia.

El cuadro muestra el color de los medios de cultivo modificando la concentración de nitrógeno, referido al Cuadro 1, después de una fermentación de 52h de P.A., así como su código y nombre Pantone, y los valores Cie L*a*b de estos.










Cuadro 5 Análisis colorimétrico de los medios de cultivos con las modificaciones en la concentración de nitrógeno para la cepa P.B. a las 52 h

Medio	Color	Pantone		Cie L*a*b		
		Código	Nombre	L (± 0.05)	a (± 0.05)	b (± 0.05)
α N		17-1022TCX	Kelp	57.00	-1.00	22.00
α 1/2 N		17-0625TCX	Boa	57.00	-1.05	27.05
α 1/4 N		17-0619TCX	Overland Trek	55.02	0.02	9.99
β N		18-0830TCX	Butternut	51.00	2.00	21.02
β 1/2 N		19-0315TCX	Black Forest	33.00	-7.02	9.00
β 1/4 N		18-0724TCX	Gothic Olive	49.00	1.00	7.03
γ N		18-0830TCX	Butternut	45.00	3.00	25.00
γ 1/2 N		17-0517TCX	Dusky Green	46.98	-1.00	14.02
γ 1/4 N		17-5800TCX	Hematite	48.02	-1.00	8.01

Fuente: Elaboración propia.

El cuadro muestra el color de los medios de cultivo modificando la concentración de nitrógeno, referido al Cuadro 1 después de una fermentación de 52h de P.B., así como su código y nombre Pantone, y los valores Cie L*a*b de estos.

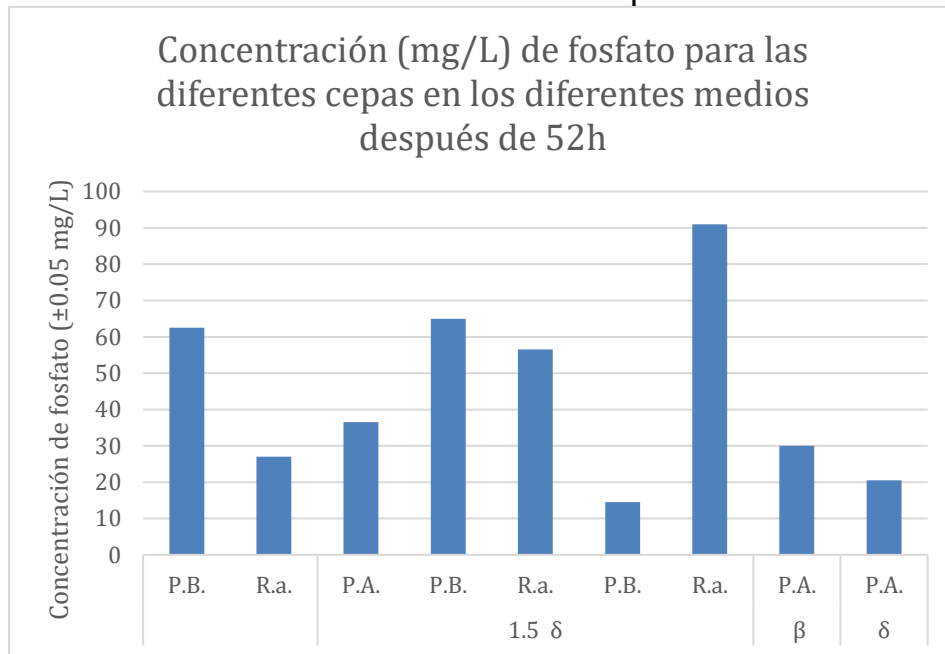
Cuadro 6 Análisis colorimétrico de los medios de cultivos con las modificaciones en la concentración de nitrógeno para la cepa R.a. a las 52 h

Medio	Color	Pantone		Cie L*a*b		
		Código	Nombre	L (± 0.05)	a (± 0.05)	b (± 0.05)
α N		17-0929 TCX	Fennel Seed	56.01	0.02	25.97
α 1/2 N		17-1019 TCX	Elmwood	52.98	1.03	20.04
α 1/4 N		17-1310 TCX	Timber Wolf	55.00	0.02	13.01
β N		17-0935 TCX	Dull Gold	51.00	2.00	27.00
β 1/2 N		18-0629 TCX	Lizard	43.00	-3.00	23.00
β 1/4 N		17-0627 TCX	Dried Herb	52.02	1.01	18.00
γ N		17-0935 TCX	Dull Gold	49.00	2.00	29.00
γ 1/2 N		18-0617 TCX	Covert Green	50.00	0.02	15.97
γ 1/4 N		18-1108 TCX	Fallen Rock	51.02	-1.00	9.98

Fuente: Elaboración propia.

El cuadro muestra el color de los medios de cultivo modificando la concentración de nitrógeno, referido al Cuadro 1 después de una fermentación de 52h de R.a., así como su código y nombre Pantone, y los valores Cie L*a*b de estos.

Figura 32 Gráfica de concentración de fosfato para las diferentes cepas en los diferentes medios de cultivo después de 52 h



Fuente: Elaboración propia.

En la imagen se observa la concentración de fosfato después de 50h en los diferentes medios de cultivo indicados en el Cuadro 1, para las cepas. P.A., P.B., & R.a. Con la aclaración que el medio δ es el medio β con modificación de 2 veces la concentración de $MgSO_4$.

Figura 33 Imagen de varios medios de cultivo con modificación en la concentración de fósforo y magnesio sin inocular



Fuente: Elaboración propia.

En la imagen se observan los recipientes de izquierda a derecha: medio β con 1, 1.5 y 2 concentración original de fósforo y la concentración inicial de nitrógeno de 0.5 y los últimos 3 con 1, 1.5 y 2 concentración original de fósforo y la concentración inicial de magnesio de β con 1, 1.5 y 2 concentración original de fósforo y la concentración inicial de nitrógeno de 1.5, referido al Cuadro 1.

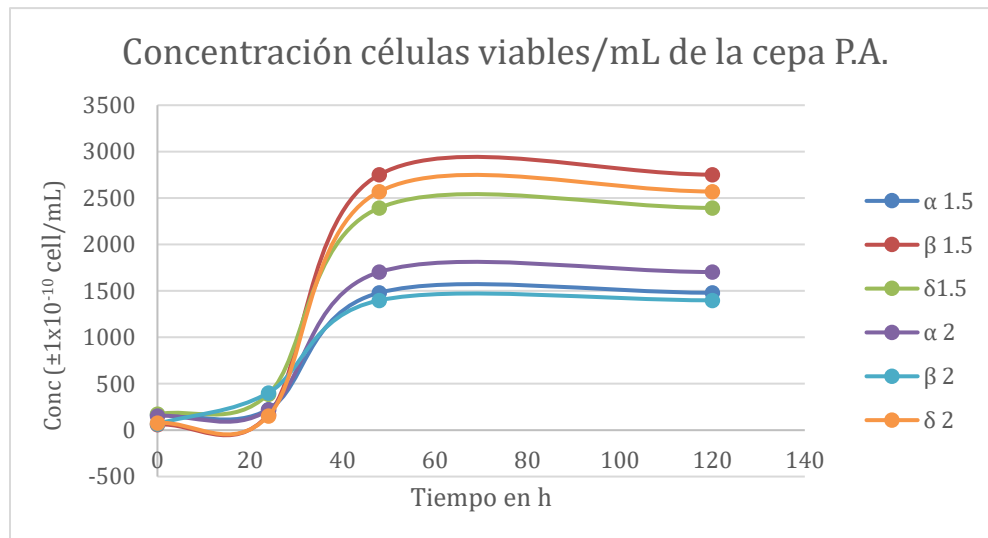
Cuadro 7 Análisis colorimétrico de los medios de cultivos con las modificaciones en la concentración de fósforo y magnesio antes de inocular

Medio	Color	Pantone		Cie L*a*b		
		Código	Nombre	L (± 0.05)	a (± 0.05)	b (± 0.05)
α 1/2 N P		16-1109TCX	Greige	56.00	1.00	31.00
α 1/2 N 1.5P		16-1109TCX	Greige	57.00	0.00	22.00
α 1/2 N 2P		16-1109TCX	Greige	58.00	0.00	11.00
β 1/2 N P		18-0724TCX	Gothic Olive	49.00	5.00	47.00
β 1/2 N 1.5P		18-0724TCX	Gothic Olive	50.00	3.00	34.00
β 1/2 N 2P		18-0724TCX	Gothic Olive	54.00	0.00	21.00
δ 1/2 N P		17-0613TCX	Vetiver	49.00	3.00	34.00
δ 1/2 N 1.5P		17-0613TCX	Vetiver	54.00	0.00	19.00
δ 1/2 N 2P		17-0613TCX	Vetiver	56.00	0.00	7.00

Fuente: Elaboración propia.

En el cuadro se observan los colores de los medios de cultivo formulados variando a la concentración de fósforo y magnesio, referido al Cuadro 1, así como su código y nombre Pantone, y los valores Cie L*a*b de estos.

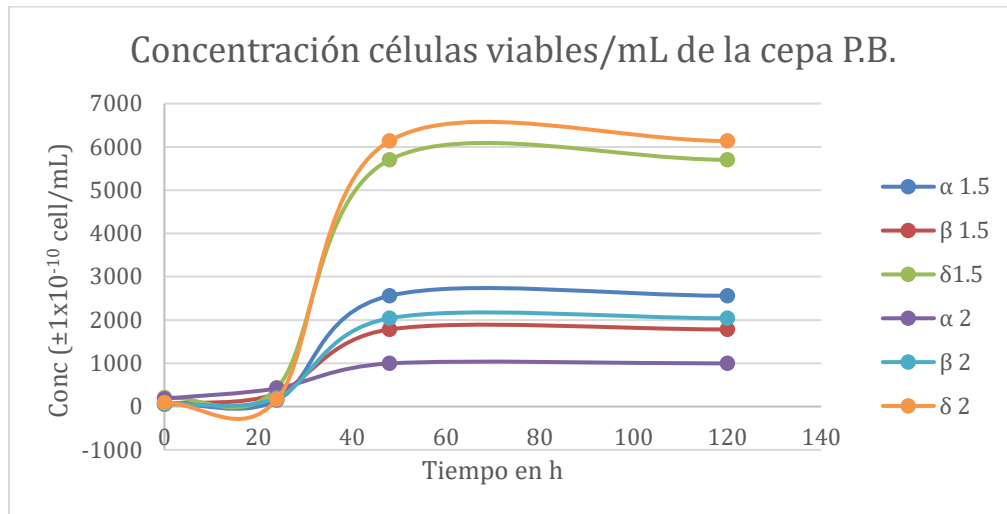
Figura 34 Gráfica de concentración de crecimiento de la cepa P.A. en los diferentes medios de cultivo con la modificación de la concentración de fósforo α & β y magnesio δ .



Fuente: Elaboración propia.

En la gráfica se observa la concentración cell/mL de P.A. por 120h para los medios modificados para fósforo y magnesio.

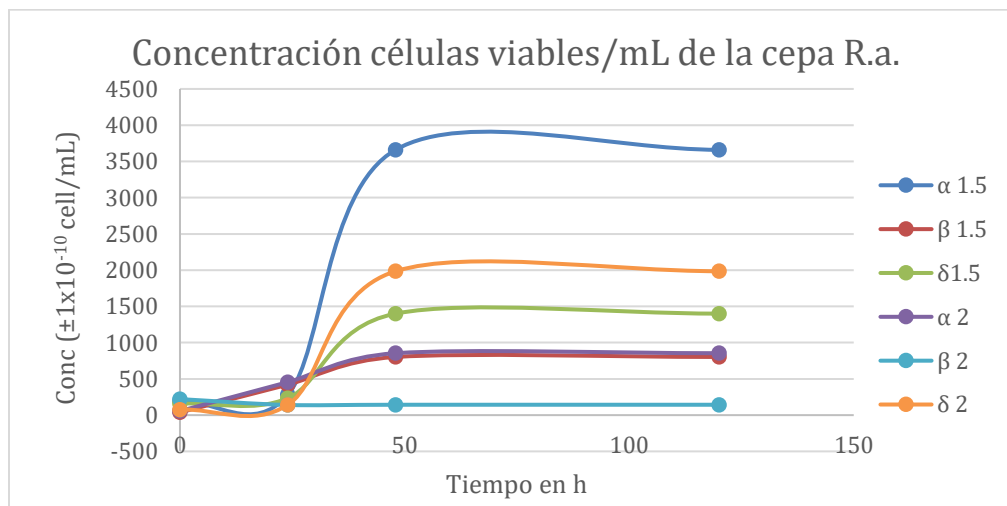
Figura 35 Gráfica de concentración de crecimiento de la cepa P.B. en los diferentes medios de cultivo con la modificación de la concentración de fósforo α & β y magnesio δ .



Fuente: Elaboración propia.

En la gráfica se observa la concentración cell/mL de P.B. por 120h para los medios modificados para fósforo y magnesio.










Figura 36 Gráfica de concentración de crecimiento de la cepa R.a. en los diferentes medios de cultivo con la modificación de la concentración de fósforo α & β y magnesio δ .



Fuente: Elaboración propia.

En la gráfica se observa la concentración cell/mL de R.a. por 120h para los medios modificados para fósforo y magnesio










Cuadro 8 Análisis colorimétrico de los medios de cultivos con las modificaciones en la concentración de nitrógeno para la cepa P.A. a las 52 h

Medio	Color	Pantone		Cie L*a*b		
		Código	Nombre	L (±0.05)	a (±0.05)	b (±0.05)
α1/2 N P		10-1028 TCX	Antique Bronze	54.00	0.02	27.00
α1/2 N 1.5P		18-0830 TCX	Butternut	48.00	1.04	31.00
α1/2 N 2P		18-0523 TCX	Winter Moss	29.00	1.01	25.00
β 1/2 N P		18-0317 TCX	Bronze Green	43.00	-1.05	13.00
β 1/2 N 1.5P		18-0830 TCX	Butternut	47.00	1.04	27.00
β 1/2 N 2P		18-0430 TCX	Avocado	40.98	3.00	28.00
δ 1/2 N P		19-0230 TCX	Garden Green	39.00	-1.04	20.00
δ 1/2 N 1.5P		18-0322 TCX	Cypress	36.00	-1.04	16.00
δ 1/2 N 2P		19-0622 TCX	Military Olive	87.00	0.00	1.00

Fuente: Elaboración propia.

El cuadro muestra el color de los medios de cultivo de fósforo y magnesio modificado, referido al Cuadro 1, después de una fermentación de 52h de P.A., así como su código y nombre Pantone, y los valores Cie L*a*b de estos.










Cuadro 9 Análisis colorimétrico de los medios de cultivos con las modificaciones en la concentración de nitrógeno para la cepa P.B. a las 52 h

Medio	Color	Pantone		Cie L*a*b		
		Código	Nombre	L (±0.05)	a (±0.05)	b (±0.05)
α1/2 N P		18-0422 TCX	Loden Green	48.00	-6.00	18.00
α1/2 N 1.5P		18-0622 TCX	Olive Drab	45.00	-3.00	23.00
α1/2 N 2P		17-0935 TCX	Dull Gold	49.97	0.02	28.00
β 1/2 N P		17-0636 TCX	Geen Moss	51.04	2.00	31.00
β 1/2 N 1.5P		17-0627 TCX	Dried Herb	51.02	1.02	20.00
β 1/2 N 2P		18-0724 TCX	Gothic Olive	48.00	1.01	18.00
δ 1/2 N P		18-0825 TCX	Nutria	44.00	2.00	25.00
δ 1/2 N 1.5P		19-0230 TCX	Garden Green	35.00	-1.01	15.00
δ 1/2 N P		19-0323 TCX	Chive	34.00	-6.00	19.00

Fuente: Elaboración propia.

El cuadro muestra el color de los medios de cultivo de fósforo y magnesio modificado, referido al Cuadro 1, después de una fermentación de 52h de P.B., así como su código y nombre Pantone, y los valores Cie L*a*b de estos.

Cuadro 10 Análisis colorimétrico de los medios de cultivos con las modificaciones en la concentración de nitrógeno para la cepa R.a. a las 52 h

Medio	Color	Pantone		Cie L*a*b		
		Código	Nombre	L (±0.05)	a (±0.05)	b (±0.05)
α 1/2 N P		18-0324 TCX	Calliste Green	49.99	-6.00	20.00
α 1/2 N 1.5P		19-1034 TCX	Breen	40.00	9.02	27.00
α 1/2 N 2P		18-0830 TCX	Butternut	45.00	4.00	27.00
β 1/2 N P		17-1028 TCX	Antique Bronze	53.00	0.02	29.00
β 1/2 N 1.5P		17-0636 TCX	Geen Moss	49.99	-1.00	26.00
β 1/2 N 2P		18-0322 TCX	Cypress	39.00	-1.05	19.00
δ 1/2 N P		19-0512 TCX	Ivy Green	33.00	-6.00	27.00
δ 1/2 N 1.5P		19-0419 TCX	Rifle Green	35.00	-6.00	26.00
δ 1/2 N P		19-0323 TCX	Chive	32.00	-5.00	19.00

Fuente: Elaboración propia.

El cuadro muestra el color de los medios de cultivo de fósforo y magnesio modificado, referido al Cuadro 1, después de una fermentación de 52h de R.a., así como su código y nombre Pantone, y los valores Cie L*a*b de estos.

Estadística para P.A.

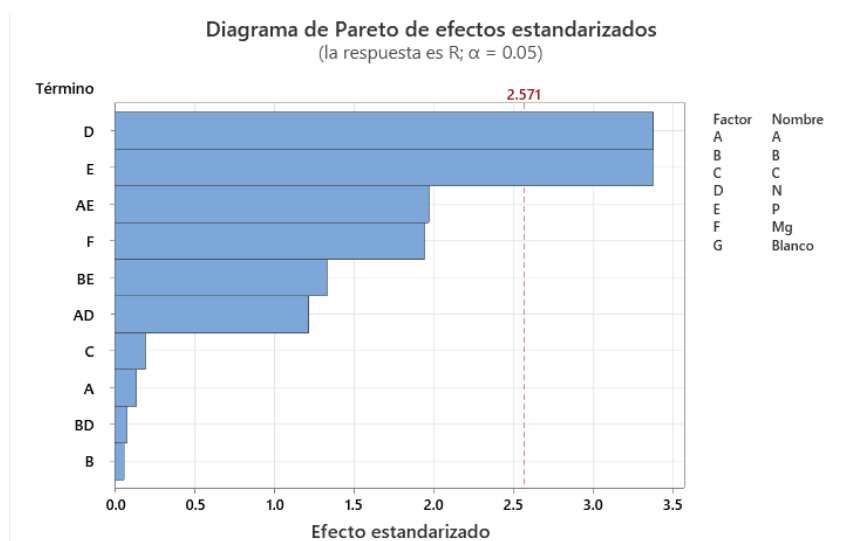
Cuadro 11 Análisis de varianza para fermentaciones líquidas de P.A.

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
Modelo	10	1603.51	160.351	5.55	0.036
Lineal	6	895.09	149.182	5.16	0.046
A	1	0.55	0.552	0.02	0.895
B	1	0.10	0.100	0.00	0.955
C	1	1.07	1.068	0.04	0.855
N	1	329.06	329.056	11.39	0.020
P	1	328.75	328.751	11.38	0.020
Mg	1	108.80	108.804	3.77	0.110
Interacciones de 2 términos					
A*N	1	42.65	42.645	1.48	0.279
A*P	1	112.07	112.073	3.88	0.106
B*N	1	0.19	0.188	0.01	0.939
B*P	1	51.21	51.215	1.77	0.240
Error	5	144.44	28.888		
Total	15	1747.95			

Fuente: Elaboración propia.

El Cuadro 11 muestra el análisis de varianza de las fermentaciones líquidas de P.A con sus valores GL, SC ajustado, MC ajustado, Valor F y Valor P.

Figura 37 Diagrama de Pareto para las fermentaciones de P.A.



Fuente: Elaboración propia.

La figura muestra el Diagrama de Pareto de la producción de pigmentos asociado a las concentraciones de nutrientes en los medios para la cepa P.A, siendo el valor significativo 2.571, lo que indica que, si el efecto estadístico del término es mayor a este, este es relevante para la obtención del biopigmento.

Estadística para P.B.

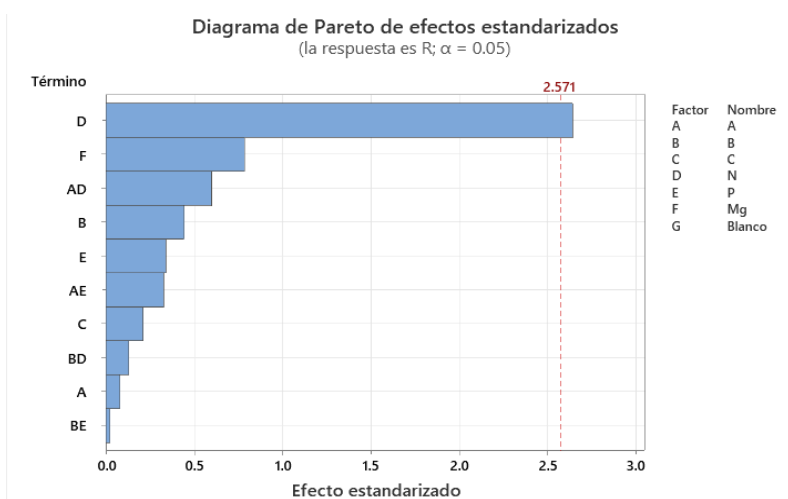
Cuadro 12 Análisis de varianza para fermentaciones líquidas de P.B.

Fuente	GL	SC	MC	Valor	Valor
		Ajust.	Ajust.	F	p
Modelo	10	2016.28	201.628	2.02	0.227
Lineal	6	999.75	166.625	1.67	0.296
A	1	0.65	0.652	0.01	0.939
B	1	19.75	19.754	0.20	0.675
C	1	4.47	4.471	0.04	0.841
N	1	697.42	697.423	6.98	0.046
P	1	11.52	11.523	0.12	0.748
Mg	1	61.49	61.492	0.62	0.468
Interacciones de 2 términos					
A*N	1	35.76	35.757	0.36	0.576
A*P	1	10.68	10.685	0.11	0.757
B*N	1	1.73	1.731	0.02	0.900
B*P	1	0.06	0.061	0.00	0.981
Error	5	499.87	99.974		
Total	15	2516.15			

Fuente: Elaboración propia.

El Cuadro 12 muestra el análisis de varianza de las fermentaciones líquidas de P.B con sus valores GL, SC ajustado, MC ajustado, Valor F y Valor P.

Figura 38 Diagrama de Pareto para las fermentaciones de P.B.



Fuente: Elaboración propia.

La figura muestra el Diagrama de Pareto de la producción de pigmentos asociado a las concentraciones de nutrientes en los medios para la cepa P.B, siendo el valor significativo 2.571, lo que indica que, si el efecto estadístico del término es mayor a este, este es relevante para la obtención del biopigmento.

Estadística para R.a

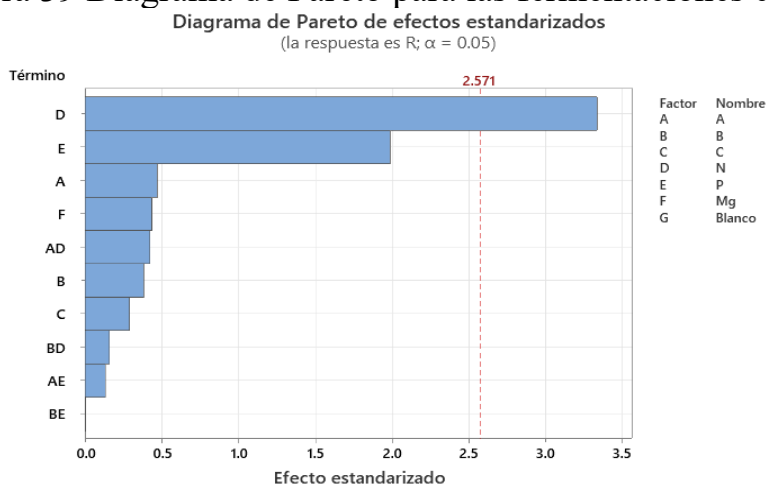
Cuadro 13 Análisis de varianza para fermentaciones líquidas de R.a.

Fuente	GL	SC		Valor F	Valor p
		Ajust.	MC Ajust.		
Modelo	10	1904.99	190.499	3.64	0.083
Lineal	6	935.74	155.956	2.98	0.126
A	1	11.63	11.631	0.22	0.657
B	1	7.70	7.699	0.15	0.717
C	1	4.44	4.438	0.08	0.783
N	1	581.69	581.692	11.11	0.021
P	1	206.57	206.569	3.95	0.104
Mg	1	9.90	9.901	0.19	0.682
Interacciones de 2 términos					
A*N	1	9.42	9.419	0.18	0.689
A*P	1	0.92	0.918	0.02	0.900
B*N	1	1.36	1.358	0.03	0.878
B*P	1	0.00	0.001	0.00	0.997
Error	5	261.71	52.343		
Total	15	2166.71			

Fuente: Elaboración propia.

El Cuadro 13 muestra el análisis de varianza de las fermentaciones líquidas de R.a. con sus valores GL, SC ajustado, MC ajustado, Valor F y Valor P.

Figura 39 Diagrama de Pareto para las fermentaciones de R.a.



Fuente: Elaboración propia.

La figura muestra el Diagrama de Pareto de la producción de pigmentos asociado a las concentraciones de nutrientes en los medios para la cepa R.a., siendo el valor significativo 2.571, lo que indica que, si el efecto estadístico del término es mayor a este, este es relevante para la obtención del biopigmento.

D. Comparación de la intensidad/saturación por medio de tinción en autoclave de los pigmentos obtenidos con los colorantes comerciales como sustituto de origen biológico a los tintes actuales

Figura 40 Tinción de pigmentos sin modificación de medio de cultivo por método de autoclave luego de 52h de fermentación



Fuente: Elaboración propia.

En la figura se observa la placa de secado para los medios de cultivo formulados no modificados siendo las columnas de izquierda a derecha los medios α , β , γ y las filas de arriba abajo blanco, cepa PA, cepa PB y cepa Ra.

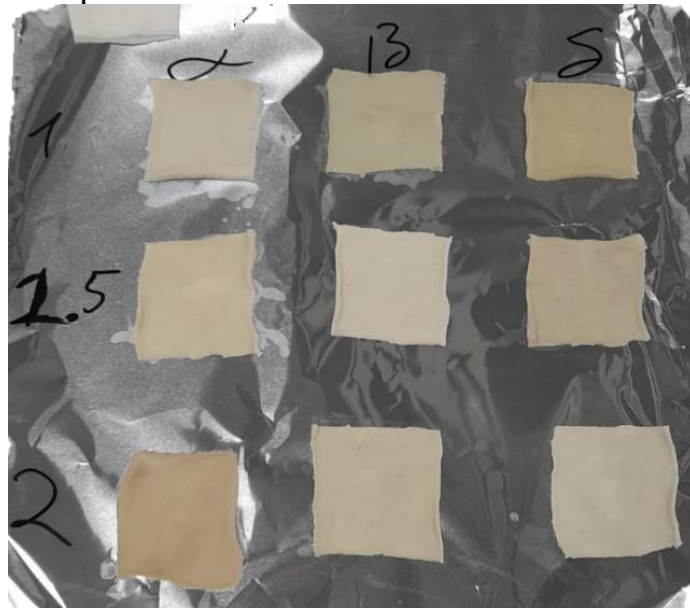
Cuadro 14 Espacio Ciel*a*b de la tinción de pigmentos sin modificación de medio de cultivo por método de autoclave luego de 52h de fermentación

Medio	Color	Pantone		Cie L*a*b		
		Código	Nombre	L (± 0.05)	a (± 0.05)	b (± 0.05)
α	PA	13-0000TCX	Moonbeam	82.85	-0.76	8.89
	PB	13-0403TCX	Gray Morn	78.99	-0.76	2.99
	Ra	14-0000TCX	Silver Gray	82.22	0.82	9.99
β	PA	16-1102TCX	Isalnd Fossil	78.81	-0.84	16.26
	PB	14-0702TCX	Incrustable	77.17	-0.54	16.72
	Ra	16-1305TCX	String	74.26	-1.05	13.56
γ	PA	13-0404TCX	Ancient Scroll	72.41	0.44	27.07
	PB	13-5304TCX	Rainy Day	78.06	0.03	27.55
	Ra	14-4501TCX	Silver Lining	71.99	0.72	28.85

Fuente: Elaboración propia

El cuadro muestra el color de las telas teñidas con los medios fermentados con las concentraciones de nitrógeno, fósforo y magnesios originales del Cuadro 1, después de 52h, así como su código y nombre Pantone, y los valores Cie L*a*b de estos.











Figura 41 Tinción de cuadros de 5x5cm de tela de algodón con biopigmentos de P.A. de los medios de cultivo modificados con nitrógeno, fósforo y magnesio después de 52 horas de fermentación



Fuente: Elaboración propia.

En la imagen se observa la placa de secado de P.A. de los medios α , β y δ .

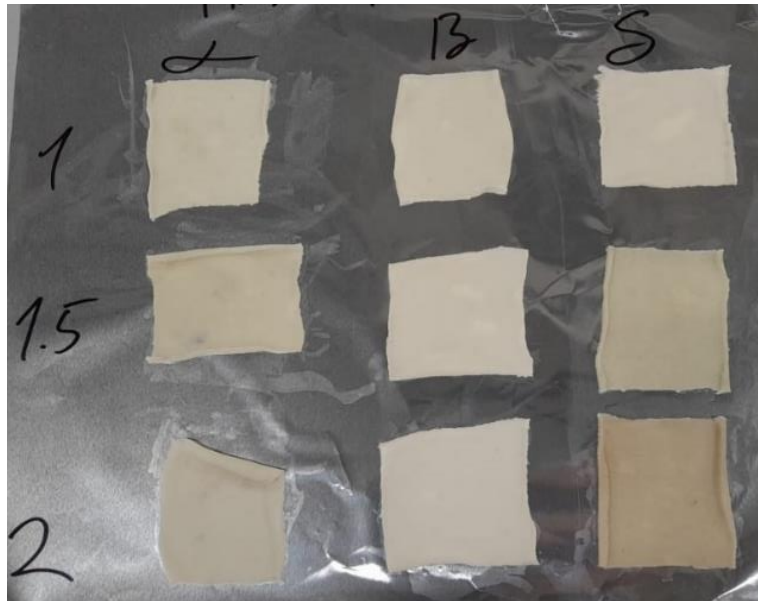
Cuadro 15 Espacio Ciel*a*b de la tinción de pigmentos optimizados a 1/2 veces la concentración inicial de nitrógeno y variando las concentraciones de fósforo, por método de autoclave luego de 52h de fermentación para la cepa P.A.

Medio	Color	Código	Nombre	L (±0.05)	a (±0.05)	b (±0.05)	Rendimiento
Blanco		14-0002 TCX	Pumice Stone	79.00	0.00	3.00	32%
α 1/2N P		15-1305 TCX	Feather Gray	72.00	0.00	11.00	11%
α 1/2N1.5P		15-1216 TCX	Pale Khaki	73.00	1.00	16.00	-4%
α 1/2N 2P		16-1010 TCX	Incense	64.00	3.00	19.00	10%
β 1/2N P		16-1108 TCX	Twill	67.00	-1.00	15.00	-4%
β 1/2N1.5P		14-0210 TCX	Tidal Foam	74.00	0.00	10.00	-13%
β 1/2 N2P		15-1307 TCX	White Peper	70.00	1.00	13.00	5%
δ 1/2N P		16-1118 TCX	Sponge	63.00	0.00	19.00	-11%
δ 1/2N1.5P		16-1101 TCX	Trench Coat	66.00	0.00	14.00	-22%
δ 1/2 N2P		15-6410 TCX	Moss Gray	67.00	0.00	10.00	32%

Fuente: Elaboración propia.

En el cuadro se observa el color de las telas después de la tinción con los medios de cultivo modificados con 1/2 veces la concentración inicial de nitrógeno y variando las concentraciones de fósforo, referido al Cuadro 1. Por método de autoclave luego de 52h de fermentación para la cepa P.A. así como sus valores Cie L*a*b.










Figura 42 Tinción de cuadros de 5x5cm de tela de algodón con biopigmentos de P.B. de los medios de cultivo modificados con nitrógeno, fósforo y magnesio después de 52 horas de fermentación



Fuente: Elaboración propia.

En la imagen se observa la placa de secado de P.B. en los medios α , β y δ

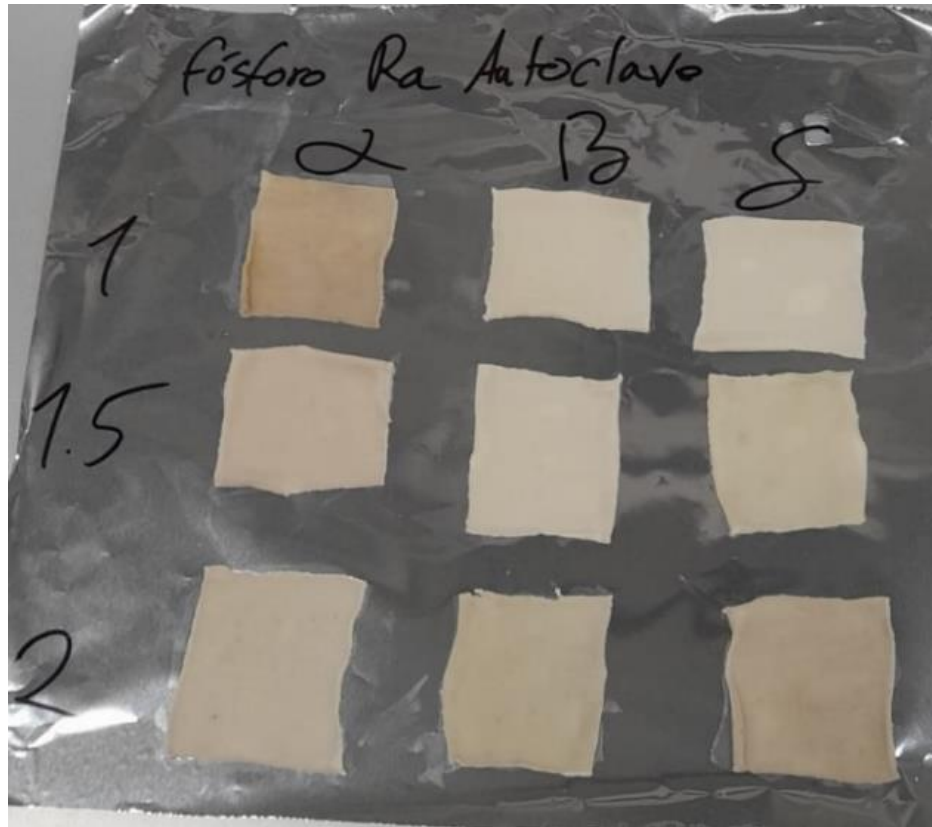
Cuadro 16 Espacio Ciel*a*b de la tinción de pigmentos optimizados a 0.5 veces la concentración inicial de nitrógeno y variando las concentraciones de fósforo

Medio	Color	Pantone		Cie L*a*b			Rendimiento
		Código	Nombre	L (±0.05)	a (±0.05)	b (±0.05)	
α 1/2N P		14-0210 TCX	Tidal Foam	71.98	0.00	9.97	13%
α 1/2N1.5P		15-1306 TCX	Oxford Tan	69.03	-0.97	14.00	-1%
α 1/2N2P		14-6408 TCX	Abbey Stone	69.00	-0.01	8.98	-7%
β 1/2N P		14-0210 TCX	Tidal Foam	74.97	0.02	10.01	14%
β 1/2N1.5P		14-0708 TCX	Cement	75.02	1.00	8.97	1%
β 1/2N2P		14-4505 TCX	Silver Lining	74.03	18.00	13.98	-10%
δ 1/2N P		14-0105 TCX	Overcast	74.00	1.03	9.03	16%
δ 1/2N1.5P		16-1108 TCX	Twill	65.02	-0.02	13.04	-10%
δ 1/2 N2P		17-1312 TCX	Silver Mink	61.00	2.00	15.99	-25%

Fuente: Elaboración propia.

En el cuadro se observa el color de las telas después de la tinción con los medios de cultivo modificados con 0.5 veces la concentración inicial de nitrógeno y variando las concentraciones de fósforo, referido al Cuadro 1. Por método de autoclave luego de 52h de fermentación para la cepa P.B. así como sus valores Cie L*a*b.










Figura 43 Tinción de cuadros de 5x5cm de tela de algodón con biopigmentos de P.A. de los medios de cultivo modificados con nitrógeno, fósforo y magnesio después de 52 horas de fermentación



Fuente: Elaboración propia.

En la imagen se observa la placa de secado de R.a. de los medios α , β y δ

Cuadro 17 Espacio Ciel*a*b de la tinción de pigmentos optimizados a 0.5 veces la concentración inicial de nitrógeno y variando las concentraciones de fósforo, por método de autoclave luego de 52h de fermentación.

Medio	Color	Pantone		Cie L*a*b			Rendimiento
		Código	Nombre	L (±0.05)	a (±0.05)	b (±0.05)	
α 1/2N P		16-1315 TCX	Cornstalk	63.02	5.00	17.98	-5%
α 1/2N1.5P		15-1116 TCX	Safari	70.03	3.03	13.00	14%
α 1/2N2P		15-1307 TCX	White Peper	68.97	2.01	11.96	1%
β 1/2N P		15-1305 TCX	Feather Gray	72.02	1.00	12.02	4%
β 1/2N1.5P		14-0210 TCX	Tidal Foam	71.99	0.96	11.01	15%
β 1/2N2P		16-1101 TCX	Trench Coat	65.04	1.04	15.04	-10%
δ 1/2N P		15-1305 TCX	Feather Gray	72.04	-0.01	10.00	10%
δ 1/2N1.5P		15-0309 TCX	Spray Green	69.01	0.04	15.00	4%
δ 1/2 N2P		16-1108 TCX	Twill	62.98	2.98	15.01	-9%

Fuente: Elaboración propia.

En el cuadro se observa el color de las telas después de la tinción con los medios de cultivo modificados con 0.5 veces la concentración inicial de nitrógeno y variando las concentraciones de fósforo, referido al Cuadro 1. Por método de autoclave luego de 52h de fermentación para la cepa P.B. así como sus valores Cie L*a*b.



Figura 44 Tinción de cuadros de 5x5cm de tela de algodón con 0.02g/L de colorantes comerciales



Fuente: Elaboración propia.

En la imagen se observa la placa de secado de las telas teñidas con colorantes comerciales

Cuadro 18 Espacio Ciel*a*b de la tinción de pigmentos comerciales

Medio	Color	Pantone		Cie L*a*b		
		Código	Nombre	L (± 0.05)	a (± 0.05)	b (± 0.05)
Verde		16-5907 TCX	Granite Green	66.00	-11.00	1.00
Verde arveja		18-0832 TCX	Plantation	40.00	2.00	31.00

Fuente: Elaboración propia.

En el cuadro se observa el color de las telas después de la tinción con soluciones 0.02g/L de tintes. así como sus valores Cie L*a*b.

Cuadro 19 Porcentaje de error entre los vectores de color obtenidos por tinción en autoclave para P.A. al compararlo con pigmentos comerciales

Medio	% de error vs Verde	% de error vs Verde arveja
α 1/2 N P	8.84%	43.81%
α 1/2 N 1.5P	11.69%	47.57%
α 1/2 N 2P	0.13%	31.95%
β 1/2 N P	2.61%	35.58%
β 1/2 N 1.5P	11.59%	47.44%
β 1/2 N 2P	6.40%	40.59%
δ 1/2 N P	1.67%	29.93%
δ 1/2 N 1.5P	0.82%	33.22%
δ 1/2 N 2P	1.23%	33.76%

Fuente: Elaboración propia.

En el cuadro se observa el porcentaje de error entre el color presente en la tela de algodón después de la tinción por autoclave para la cepa P.A. en diferentes medios al ser comparada con pigmentos comerciales.

Cuadro 20 Porcentaje de error entre los vectores de color obtenidos por tinción en autoclave para P.B. al compararlo con pigmentos comerciales

Medio	% de error vs Verde	% de error vs Verde arveja
α 1/2 N P	8.59%	43.48%
α 1/2 N 1.5P	5.27%	39.09%
α 1/2 N 2P	3.98%	37.39%
β 1/2 N P	13.03%	49.34%
β 1/2 N 1.5P	12.91%	49.19%
β 1/2 N 2P	15.76%	52.95%
δ 1/2 N P	11.42%	47.22%
δ 1/2 N 1.5P	0.90%	30.94%
δ 1/2 N 2P	5.72%	24.57%

Fuente: Elaboración propia.

En el cuadro se observa el porcentaje de error entre el color presente en la tela de algodón después de la tinción por autoclave para la cepa P.B. en diferentes medios al ser comparada con pigmentos comerciales.

Cuadro 21 Porcentaje de error entre los vectores de color obtenidos por tinción en autoclave para R.a. al compararlo con pigmentos comerciales

Medio	% de error vs Verde	% de error vs Verde arveja
α 1/2 N P	1.78%	29.78%
α 1/2 N 1.5P	6.53%	40.76%
α 1/2 N 2P	4.65%	38.28%
β 1/2 N P	9.12%	44.18%
β 1/2 N 1.5P	8.84%	43.81%
β 1/2 N 2P	0.23%	31.82%
δ 1/2 N P	8.68%	43.60%
δ 1/2 N 1.5P	5.54%	39.45%
δ 1/2 N 2P	3.15%	27.97%

Fuente: Elaboración propia.

En el cuadro se observa el porcentaje de error entre el color presente en la tela de algodón después de la tinción por autoclave para la cepa R.a. en diferentes medios al ser comparada con pigmentos comerciales.

VIII. Discusión

En este estudio, se exploró el potencial de pigmentos microbianos como una alternativa sostenible a los colorantes sintéticos convencionales. Para ello se desarrollaron 16 formulaciones de medios de cultivo para maximizar la producción de pigmentos solubles en agua por tres diferentes cepas bacterianas.

Primero, se decidió variar la fuente de carbono entre sacarosa, lactosa y azúcares solubles en agua de coco y observar en cual hay un mayor crecimiento de biomasa para pasar a la siguiente fase. Seguidamente se varió en la mitad y un cuarto la concentración de nitrógeno disminuyendo la concentración de este en el medio y seguir seleccionando los medios en el que se vea favorecida la producción de pigmentos. Después, se aumentó en 1.5 y 2 veces la concentración de fósforo en los medios seleccionados en la fase anterior y también se aumentó la concentración de magnesio en el medio que produce un pigmento con tonalidades similares a los medios comerciales. Por último, se comparó el desempeño de estos pigmentos con colorantes comerciales en pruebas de tinción textil.

Para la obtención de estos pigmentos de primero se seleccionaron 3 diferentes bacterias; P.A., P.B. & R.a.. La primera puede producir piocianina (pigmento de color azul verdoso), pioverdina (pigmento fluorescente de color verde amarillento) y piorrubina (de color rojo). P.B. puede producir también piocianina (McDougald, D., Klebensberger, J., Tolker-Nielsen, T., Webb, J. S., Conibear, T., Rice, S. A., & Kjelleberg, S, 2008). Mientras que R.a. produce carotenoides (pigmentos rosado-anaranjado) (Cappelletti, M., Presentato, A., Piacenza, E., Firrincieli, A., Turner, R. J., & Zannoni, D., 2020). Para mejorar el crecimiento y producción de pigmentos en los microorganismos seleccionados, se diseñaron 16 formulaciones de medios de cultivo. Se variaron las fuentes de carbono, nitrógeno, fósforo y magnesio (sacarosa vs lactosa, extracto de levadura, peptona, fosfato dipotásico y sulfato de magnesio), modificaciones permitieron evaluar el impacto de cada nutriente en la producción de pigmentos. Por otro lado, la forma de evaluar los pigmentos fueron 1) pigmentos en soluciones líquidas 2) coloración de telas de algodón. Ambos métodos se analizaron mediante el sistema de colores Cie L*a*b, el cual es un método colorimétrico que tienen parámetros de luminosidad e intensidad de colores y se asimila de mejor manera los resultados con los colores que puede reconocer el ojo humano. Mientras que para medir como afectaba el nitrógeno y fósforo se utilizaron los métodos de

cuantificación por métodos colorimétricos del nitrógeno utilizando el método de Kehlaj y para fosfatos utilizando el método colorimétrico de fosfatos totales del Hatch®. Se decidió realizar los cambios en las concentraciones de nitrógeno (1.8,0.9,0.45 g/L) y fosfato (0.689, 1.0335,1.378 g/L) para proporcionar estrés metabólico y con ello conseguir aumentar la producción de subproductos, entre ellos pigmentos bacterianos (Abdelaziz, 2023). adicionalmente se realizó un cambio de sulfato de magnesio de 1.5g/L a 3 g/L con el fin de determinar si los metales ayudan a la producción de pigmentos o, por el contrario, no la favorecen.

En el Cuadro 1 se pueden ver los ingredientes de los medios nutritivos formulados basándose en los requisitos que necesitan las bacterias para crecer, es por ello por lo que contienen algún azúcar en 10 (g/l), extracto de levadura y peptona como fuente de nitrógeno (5g/l), fósforo como KH_2PO_4 y se le añadió peptona para un crecimiento veloz (Okafor, N., & Okeke, B. C., 2017). Además, para formular para el medio γ se basó en añadir en menor medida los nutrientes que deberían añadirse a las otras formulaciones, pero sin azúcar, pues se asume que estos están presentes en el agua de coco, esto se debe a que el agua de coco se ha reportado con anterioridad como medio de cultivo para microorganismos, y dada la amplia producción de coco en Guatemala, se decidió explorar el potencial del agua de coco como una alternativa sustentable y de bajo costo para la producción de biopigmentos a través de fermentación, formulando así el medio γ . Seguidamente como se puede observar en la Figura 12 se comparan los medios formulados con el medio nutritivo comercial. En esta se ve que los medios α y β tiene un color beige-incoloro, mientras que el medio γ es un poco más oscuro a pesar de que tiene menos ingredientes, esto ocurre pues el agua de coco es más turbia que el agua destilada y refleja más los colores, por lo que se recomienda realizar también una dilución de agua de coco en agua destilada para reducir la turbidez. Esto adquiere una particular importancia a la hora de obtener colores puros, los cuales serán medidos en la industria en liquido y en la tela. Esto debido a que existen componentes en el medio de cultivo que pueden tener ya de por sí un color, pero estos al no ser hidrosolubles no pasan a las telas por el método de tinción elegido y por ende el color obtenido en las fermentaciones sumergidas no es en realidad el color de los pigmentos producidos por los 3 microorganismos que se pusieron a prueba.

En las figuras 13, 14 y 15 se puede apreciar el cambio de la coloración de los medios α , β , & γ pasadas las 52 horas, lo que indica un crecimiento de las células de las bacterias en estos, así mismo en las figuras 16, 17 y 18 se puede apreciar el

crecimiento de las 3 cepas en los 3 diferentes medios de cultivo, lo cual es un indicador de la buena adaptación de las bacterias los medios propuestos. En ello se destaca que la cepa P.A. presento un mayor crecimiento para el medio β , mientras que las cepas P.B y R.a. presentaron un mayor crecimiento en el medio α . Esto puede deberse a las diferentes rutas metabólicas principales de cada bacteria, destacando que P.A. tiene mecanismos que aprovechan de mejor manera la lactosa, mientras que las otras dos, no tienen la misma capacidad metabólica para convertir el azúcar de la leche en fuente de energía, y viceversa para la glucosa con la cepa P.A. Sin embargo, lo que se busca en este estudio es crear un estrés a las bacterias para alterar de esta manera su metabolismo y propiciar rutas metabólicas secundarias que induzcan la producción de pigmentos (David, 2009). Por ende, en esta etapa no se descarta ningún medio como candidato a la producción de pigmentos que se podrían producir al llevar a los microorganismos a un estrés por falta de metabolitos y a utilización de vías metabólicas secundarias para la supervivencia.

En estas fermentaciones se encontró pigmentos de color verde para P.B. & R.a. en el medio β 1/2 N, y colores café verdosos en los medios α 1/2 N y α 1/4 N para todas las cepas bacterianas, por lo que se eligió los medios con la mitad de las concentraciones de nitrógeno inicial como los medios que pasan a la siguiente fase de modificación con especial énfasis en el medio β 1/2 N. El Cuadro 3 presenta los valores en el sistema CIEL*a*b, que caracterizan el color obtenido para cada medio y bacteria. En esta etapa se encontraron colores claros de poca intensidad esto corresponde con los valores obtenidos en el espacio colorimétrico en donde un valor de L cercano a 100 indican colores muy claros y brillantes y mientras más cercanos a 0 indican colores más oscuros con tonos mate (Schanda, J., 2007) Para este caso los valores de L rondaban entre 40-60 lo que indica que nos colores obtenidos son de luminosidad media. Por otro lado, los valores de a y b indican la saturación del color, entre más lejos del valor de 0, mayor será la saturación del color. Estos valores de a y b de los pigmentos del medio formulado no modificado (ver Cuadro 3) tienen valores de a cercanos a 0, y de b alrededor de 20, combinando ambos vectores se encontró coloraciones café-verdoso, exceptuando el medio γ 1/4 N el cual tiene valores cercanos a 10 que en combinación de ambos vectores para este medio en el espectro del sistema CIEL*a*b se inclinan hacia el gris (Samanta, 2022).

Después se varió las concentraciones de nitrógeno en a 1, 0.5 y 0.25 veces la concentración inicial que se describió para cada medio en el Cuadro 1. Esto con el fin de observar si la reducción del nitrógeno induce la producción de pigmentos. A

primera vista al comparar el Cuadro 2 vs el Cuadro 3 se puede notar que a medida que menos nitrógeno contiene el caldo de fermentación, menor es la luminosidad (L) al igual que los parámetros a & b disminuyen sus valores, siendo estos más cercanos a 0, lo cual es positivo al notar que habrá menos interferencia colorimétrica de otras sustancias en el medio. Después se realizó la fermentación de diferentes concentraciones de nitrógeno por 120 horas y midió la concentración de nitrógeno a las 0, 14 y 50 horas, añadiendo una medición extra de 120 horas para el crecimiento celular. De los análisis realizados se encontró en las Figuras 20,24 y 28 que los microorganismos P.A. y P.B consumen el nitrógeno en una tasa similar subiendo el contenido mínimo de nitrógeno encontrado por fermentación, lo cual tiene sentido pues ambas son del mismo filo. Por otro lado, la cepa R.a. consume más rápido el nitrógeno, lo cual indica una tasa de metabolismo que cualitativamente se observa más veloz que sus contrapartes. Por otro lado, las figuras 21,22,23,25,26,27,29,30 y 31 muestran un mayor crecimiento de todas las bacterias en los 3 medio de cultivo propuestos con la mitad de concentración de nitrógeno inicial, permitiendo que los microorganismos se adaptaron de mejor manera en estos medios aún en estrés. Seguidamente se midieron los valores colorimétricos de cada fermentación, presentándose en los cuadros 4-6 los valores en el sistema CIEL*a*b, que caracterizan el color obtenido para cada medio y bacteria.

Para la siguiente etapa experimental se indujo un mayor estrés a los microorganismos. Para ello, se procedió a modificar las concentraciones iniciales de fosfato en los medios de cultivo (1,5 y 2 veces los valores de fosfatos del Cuadro 3). Al incrementar la disponibilidad de fósforo en forma de fosfato, se buscaba forzar a los microorganismos a activar rutas metabólicas alternativas para mantener el balance energético y evitar la toxicidad por exceso de fósforo. Este estudio sin embargo afecta la producción de biomasa como se puede ver en las figuras 33-35. Esto pues dada la ausencia de mitocondrias en estos organismos, la capacidad de autorregularse ante estas condiciones es limitada, lo que los obliga a emplear mecanismos adaptativos menos eficientes o rutas secundarias. No obstante, se espera que el fósforo adicional estimule la síntesis de biomoléculas esenciales como ácidos nucleicos, fosfolípidos y ATP, favoreciendo así el crecimiento y la producción de pigmentos al ser estos subproductos de estas (Tseng, Y. Y., Chen, M. T., & Lin, C. F. , 2000). En la Figura 32 se muestran las concentraciones de fosfato de 9 de las 18 fermentaciones realizadas y en todas se puede ver que se disminuyó la concentración de fosfato quedando la más alta en 90 mg/L y la más baja en 15 mg/L. Se eligieron estas 9 fermentaciones para realizar el análisis ya que eran las que mayor producción

de pigmento presentaron. Esto también se puede verificar en los cuadros 8-10. En estos mismos cuadros se puede notar que todas las bacterias en los medios modificados de fosfatos presentan una coloración ya sea verde o anaranjado. Lo cual indica que el cambio de fosfatos induce la producción de carotenoides y pioverdina, con valores de a^* entre -6 y 9 y valores de b^* entre 1-29, los cuales al compararlo con las fermentaciones con los medios no modificados y las de nitrógeno modificadas, se encuentran ahora valores más cercanos a los pigmentos comerciales.

Por ello, para comparar y encontrar el factor determinante en la producción de pigmentos en fermentaciones sumergidas se realizó un análisis de diseño de experimentos factorial (DOE) de 7 factores (los 3 medios de cultivo, la variación de nitrógeno, fósforo, magnesio y un blanco para control) y después de ingresar como respuesta la magnitud del vector CIEL* a^*b^* se encontró que el factor que mayor impacto tiene en la producción de biopigmentos es la concentración de nitrógeno tal y como se puede ver en los cuadros 11-13, con valores P-value de 0.02, 0.046 y 0.21 para las cepas P.A., P.B., y R.a. respectivamente. Por otro lado, el fósforo presentó un efecto significativo en algunos casos, con valores de 0.02, 0.748 y 0.104 para las mismas cepas, lo que sugiere que su influencia depende del contexto del medio de cultivo. Este análisis permitió identificar que el efecto del nitrógeno es estadísticamente significativo ($p < 0.05$) en los medios P.A. y P.B., mientras que en R.a. su influencia fue menos marcada. Este resultado sugiere que la optimización de la concentración de nitrógeno podría ser una estrategia clave para maximizar la producción de pigmentos en fermentaciones sumergidas

Esto mismo se puede identificar al analizar los análisis de Pareto (figuras 37-39) para las 3 cepas estudiadas. Donde el nitrógeno es el valor del efecto estandarizado que en todos los casos sobrepasa la línea de nivel significativo para las 3 bacterias estudiadas con valores de 3.4, 2.6 y 3.39 para las cepas P.A., P.B., y R.a, mientras el fósforo solo lo consigue una vez siendo sus valores de efecto estandarizado para las cepas P.A., P.B., y R.a. de 3.4, 0.4 y 2.0 respectivamente. Además, se encontró que el magnesio fue el segundo valor significativo en el medio que contenía lactosa como fuente de carbono y el fósforo para los otros dos medios. Esto se debe a que el medio β es el único que se le modificó las concentraciones de magnesio, y acorde a los resultados colorimétricos, fue el medio que mayor saturación de color presento para todas las cepas, por lo que tienen sentido que en este caso el valor de magnesio sea parecido al nitrógeno. Por otro lado, se encontró que un comportamiento directamente proporcional a la cantidad de fósforo suministrado al medio e

inversamente proporcional para la cantidad de nitrógeno presente en la fermentación sumergida.

Seguidamente se realizaron los análisis de tinción de cuadros 5x5 cm de tela de algodón sin pretratamiento. La Figura 40 presenta los resultados de la tinción por autoclave de biopigmentos en medios de cultivo líquidos sin modificaciones. La Figura 40 muestra la apariencia visual de los biopigmentos depositados en una placa de secado, mientras que el Cuadro 12 presenta los valores en el sistema CIEL*a*b, que caracterizan el color obtenido para cada medio y bacteria. En esta primera tinción se puede observar en la placa de secado (Figura 40) que se encontraron colores claros de alta intensidad esto corresponde con los valores obtenidos en el espacio colorimétrico en donde un valor de L cercano a 100 indican colores muy claros y brillantes (Schanda, J., 2007). Los valores de a y b indican la saturación del color, entre más lejos del valor de 0, mayor será la saturación del color. Estos valores de a y b de los pigmentos del medio formulado no modificado (ver Cuadro 15) tienen valores de a y b cercanos a 0 que en combinación de ambos vectores en el espectro del sistema CIEL*a*b se inclinan hacia el gris, con algunas variaciones hacia el naranja en el caso del medio γ . (Samanta, 2022). También se compararon con la referencia del color verde y verde arveja comercial de la marca Prumisa® los cuales son un color verde oscuro intenso y un verde opaco-café respectivamente. Se encontró que los valores de b de los pigmentos extraídos estaban en su mayoría cerca del valor de la referencia, pero los valores de L y a distaban de lo esperado con los pigmentos comerciales.

Es por ello por lo que se realizó una segunda tinción con los medios mejorados variando las concentraciones de nitrógeno a la mitad de los valores iniciales en de peptona y extracto de levadura y para los medios δ también se modificó la concentración de sulfato de magnesio en 1.5 en las cantidades que se indican en el Cuadro 2, y diferentes concentraciones de fosfatos (1, 1.5 y 2 veces lo indicado en el Cuadro 2). Siendo las figuras 41-43 análogas a la Figura 40 para los resultados de la tinción por autoclave de biopigmentos en medios de cultivo mejorados. Las figuras 41-43 muestran un cambio leve en los colores en la placa de secado en comparación con la Figura 40 Se distinguen fragmentos de tela de color café-verdoso, amarillo, beige y naranja, lo que indica una mayor variedad y saturación de los pigmentos obtenidos. También se encontró que los valores de L para todas las cepas y todos los medios (ver cuadros 15-17) disminuyeron al compáralos con los valores de los cuadros 8-10 lo que indica colores con menor luminosidad y mayor

intensidad (Schanda, J., 2007). En cambio, para los valores de a y b de los cuadros 15-17 hubo cambios pues se encontraron varias tonalidades de verde, beige y una de rojo mas no con la saturación esperada debido a que los valores de a y b aún son bajos y en el caso de los pigmentos verdes no se logró obtener combinaciones de valores de a y b que estuvieran ambos cerca del color de referencia en la tela. También en los mismos cuadros se puede ver que el rendimiento en saturación por unidad de área del proceso de tinción que para P.A va desde -22% a 32%, para P.B. de -25% a 16% y para R.a. de -10% a 15%. Lo que indica que el proceso de tinción en tela de algodón de los biopigmentos obtenidos varia comparándolo con los pigmentos en la fermentación.

Este cambio puede deberse a diversos factores. El primero de ellos es que no se realizó ningún pretratamiento a la tela como agregar un mordiente, como vinagre, sal común o sales metálicas, a la tela de algodón para ayudar a que esta pueda crear enlaces químicos con el biopigmento, el segundo es hacer un postratamiento para ayudar a fijar el colorante a la tela (Singh, M. Patel, F. & Modi, N., 2020). El tercero es a la hora de realizar la tinción por autoclave se pudo dar una oxidación y/o hidrólisis. Para la pioverdina, la hidrólisis, especialmente en condiciones ácidas causa la ruptura de los enlaces peptídicos y la oxidación de los grupos cromóforos lo que repercute en una pérdida de un cambio de color del pigmento (Gillani, T., Ullah, N., Sarwar, A., Farooq, M. H., Aziz, T., Alharbi, M., ... & Alasmari, A. F., 2024). También los carotenoides se ven afectados por la oxidación puede causar una pérdida de la conjugación de los dobles enlaces, lo que resulta en una decoloración (Wibowo, 2015). Un cuarto factor es el proceso de secado, que en este caso se dio a 40°C por 2 horas. La disminución del color o cambio en las tonalidades de los biopigmentos puede atribuirse a una combinación de factores interrelacionados, centrados principalmente en la inestabilidad térmica de los biopigmentos y la fragilidad de las interacciones pigmento-fibra. Ocurriendo una desorción del pigmento al aumentar la energía cinética de las moléculas y debilitar las interacciones débiles (como las de Van der Waals) con la celulosa del algodón (Kumar, A., Dixit, U., Singh, K., Gupta, S. P., & Beg, M. S. J., 2021).

Por último, se tiño también la misma área de tela con los pigmentos comerciales Verde y Verde arveja de Prumisa ® (Figura 44) y obtuvo sus valores colorimétricos en el rango de color Ciel*a*b (ver Cuadro 18). Después se realizó una comparación de color en tela de estos pigmentos vs los biopigmentos obtenidos y se encontró parecidos entre el color verde y los biopigmentos, con un porcentaje de error que

va desde los 0.23%-15%, mientras que para el color verde arveja entre los 24%-48% (cuadros 19-21). Por lo que puede concluirse que si bien los biopigmentos no tienen la misma saturación por unidad de área hay dos (P.A. en α 1/2 N 2P y R.a. en β 1/2 N 2P) que podrían ser una alternativa al pigmento verde comercial. Los demás pigmentos no podrán ser utilizados como alternativa a estos pigmentos comerciales de momento por lo que se sugiere ampliar la investigación siguiendo las recomendaciones descritas en esa sección.

Finalmente se puede mencionar que se obtuvieron biopigmentos de las tres cepas bacterianas en los medios mejorados que cambiaron su tonalidad durante el proceso de tinción de verde y anaranjado a tonos de café. Sin embargo, aún se requiere ajustar la combinación de nutrientes, especialmente nitrógeno y fósforo, para optimizar la saturación de los biopigmentos para que puedan ser considerados una alternativa para los tintes comerciales.

IX. Conclusiones

- Se formularon tres medios de cultivo distintos, identificados como medios α , β y γ . variando la fuente de carbono entre sacarosa, lactosa y azucares fermentables disueltos presentes en el agua de coco. Antes de la inoculación, los medios presentaron diferentes tonalidades, siendo el medio γ , a base de agua de coco, el más turbio. A pesar de estas variaciones iniciales, cada medio proporcionó condiciones adecuadas para el crecimiento bacteriano, alcanzando la viabilidad celular mayor a 2.3×10^3 UFC/mL para las 3 bacterias estudiadas alrededor de las 24 horas. Sin embargo, ninguno de los medios indujo la producción detectable de pigmentos en las cepas evaluadas.
- Las cepas bacterianas mostraron distintos niveles de crecimiento de biomasa según el medio de cultivo. La cepa P.A. tuvo un rendimiento superior en el medio β , siendo este de $7.62E+03$ UFC/mL, mientras que P.B. y R.a. alcanzaron mayor crecimiento en el medio α ($6.54E+03$ UFC/mL y $5.39E+04$ UFC/mL respectivamente). En contraste, el medio γ produjo la menor cantidad de biomasa en las tres bacterias, probablemente debido a su composición reducida de nutrientes. Al no detectarse pigmento se encontró que el rendimiento es nulo y sugiere modificar las concentraciones de nutrientes en los 3 medio de cultivo para inducir su producción.
-
- La reducción de concentración de nitrógeno a la mitad y el aumento del 100% en los niveles de fósforo generaron un aumento en la producción de biopigmentos. Los cambios en estos nutrientes afectaron directamente la luminosidad y saturación de los pigmentos, confirmando su influencia en la intensidad y tonalidad de los pigmentos obtenidos. Obteniendo valores P de nitrógeno de 0.02, 0.046 y 0.21 para las cepas P.A., P.B., y R.a. respectivamente Por otro lado, el fósforo presentó un efecto menor, con valores de 0.02, 0.748 y 0.104 para las mismas cepas.

- La tinción de fibras textiles con los biopigmentos obtenidos en este estudio mediante el uso de la autoclave mostró variaciones significativas en la intensidad y saturación de los colores en comparación con los colorantes comerciales y con los encontrados en solución. Si bien se logró pigmentar las telas con variedad de tonos en los tejidos (café-verdoso, amarillo, beige y naranja), los valores CIEL*a*b de rendimiento disminuyeron hasta dos tercios en comparación con las muestras sumergidas, lo que indica que el proceso de tinción utilizado afecta negativamente la luminosidad y saturación de los biopigmentos. También se encontró parecidos entre el color verde comercial y los biopigmentos, con un porcentaje de error que va desde los 0.23%-15%, mientras que para el color verde arveja este porcentaje va de entre los 24%-48% y entre ellos dos fermentaciones (P.A. en α 1/2 N 2P y R.a. en β 1/2 N 2P) producen biopigmentos con índice de error menor al 1% indicando que podrían ser una alternativa al pigmento verde comercial.

X. Recomendaciones

- Utilizar un fijador para que la tela retenga el pigmento y este no se pierda tras el tiempo de secado.
- Realizar estudios de estabilidad de los biopigmentos y añadir una capa de antioxidante para aumentar la estabilidad del pigmento en el tiempo.
- Realizar una secuenciación a las bacterias en los últimos 9 medios, para encontrar los genes que inducen la producción de los pigmentos.
- Identificar con el IR picos característicos para poder identificar si los compuestos verdes son pioverdina, piocianina o una mezcla de ambos pigmentos y que bacteria produce cual pigmento.
- Probar variaciones de otros metales pesados como Zinc, Cobre, Hierro, Cobalto, Molibdato para observar si estos también influyen en la obtención de pigmentos hidrosolubles que producen las bacterias en este estudio.
- Probar a teñir diferentes materiales textiles diferentes al algodón, en especial en fibras sintéticas para estudiar como la estructura de estas absorbe el biopigmento.
- Realizar un análisis de propiedades fisicoquímicas y características al agua de coco para conocer mejor su composición y poder encontrar la proporción adecuada entre agua de coco-agua y nutrientes para las formulaciones del medio γ .
- Realizar un análisis Box-Behnken para encontrar las concentraciones de nitrógeno, fosfatos y metales que produzcan la mayor cantidad de pigmentos, al variar los factores mencionados anteriormente en diferentes concentraciones al mismo tiempo.
- Estudiar las rutas metabólicas de cada bacteria que producen el pigmento para identificar cual paso es el que tiene mayor repercusión en el fenotipo del colorante.
- Estudiar y probar diferentes técnicas de recuperación de pigmento para poder realizar un análisis de rendimiento del biopigmento con datos experimentales.

XI. Bibliografía

- Abdelaziz, A. A.-M.-M. (2023). Pseudomonas aeruginosa's greenish-blue pigment pyocyanin: its production and biological activities. . *Microbial Cell Factories*, 22(1), 110.
- Banco de Guatemala. (2022). *Informe económico y financiero*. Ciudad de Guatemala: Banco de Guatemala.
- Byrns, G., Barham, B., Yang, L., Webster, K., Rutherford, G., Steiner, G., & Scannell, M. . (2021). Usos y limitaciones de la lámpara ultravioleta germicida portátil para la desinfección de superficies. *Journal of Occupational and Environmental Hygiene*, 18 (sup1), S75-S85.
- Cappelletti, M., Presentato, A., Piacenza, E., Firrincieli, A., Turner, R. J., & Zannoni, D. (2020). Biotechnology of Rhodococcus for the production of valuable compounds. . *Applied microbiology and biotechnology*, 104, 8567-8594.
- Cézard, C., Farvacques, N., & Sonnet, P. . (2015). Chemistry and biology of pyoverdines, Pseudomonas primary siderophores. *Current medicinal chemistry*, 22(2), 165-186.
- Clark, M. (. (2011). *Handbook of textile and industrial dyeing: principles, processes and types of dyes*. Cambridge: Elsevier.
- Coelho, L. F., Kaltenecker, L., Zinder, S., Philpot, W., Price, T. L., & Hamilton, T. L. (2024). Purple is the new green: biopigments and spectra of Earth-like purple worlds. *Monthly Notices of the Royal Astronomical Society*, 530(2), 1363-1368.
- ColorMunki. (2014). Manual del Usuario. *ColorMunki Display X-Rite*.
- Consultancy., Exactitude. (2022, Marzo 10). *Exactitude Consultancy*. From El tamaño y la participación del mercado de colorantes superarán los 89 mil millones de dólares para:
<https://exactitudeconsultancy.com/es/informes/2003/colorantes-mercado/#report-details/pdf>
- David, N. L. (2009). *Lehninger Principios de bioquímica*. In *Lehninger Principios de bioquímica 3ª ed.* Nelson D. y Cox, M. Editorial Omega.
- Dichiara, E. L. (2019). Producción de carotenoides con capacidad antioxidante por Bacillus licheniformis Rt4M10. Mendoza, Argentina: (Doctoral dissertation, Universidad Nacional de Cuyo. Facultad de Ciencias Agrarias).

- Escudero, C. & Lires, M. (2006). Estudio da historia e dos procesos tintorios da púrpura e do índigo: aportacións para o deseño dun curso de posgrao. *Revista de investigación en educación*, 3(1), 95-114.
- Fernández, S. (2022). CARACTERIZACIÓN DE BACTERIAS ÁCIDO LÁCTICAS (BAL) PARA LA PRODUCCIÓN DE ÁCIDO LÁCTICO (AL) A ESCALA DE PLANTA PILOTO. Costa Rica: Universidad de Costa Rica (Doctoral dissertation).
- Flores Escobar, V. D. (2021). Extracción de pigmentos microbianos como alternativa a pigmentos comerciales . Guatemala: Universidad del Valle de Guatemala.
- Gillani, T., Ullah, N., Sarwar, A., Farooq, M. H., Aziz, T., Alharbi, M., ... & Alasmari, A. F. (2024). Optimization of pyoverdine pigment biosynthesis conditions from a locally isolated strain of *Pseudomonas aeruginosa*. *Biomass Conversion and Biorefinery*, 14(20), 26341-26353.
- Gonçalves, T., & Vasconcelos, U. . (2021). Colour me blue: the history and the biotechnological potential of pyocyanin. . *PMC Molecules*,, 26(4), 927.
- Gonzalez, R.C. and Woods, R.E. . (2008). *Digital Image Processing*. 3rd Edition, Pearson Prentice Hall, Upper Saddle River.
- Griffiths, M. J., Garcin, C., van Hille, R. P., & Harrison, S. T. . (2011). Interference by pigment in the estimation of microalgal biomass concentration by optical density. *Journal of microbiological methods*, 85(2), 119-123.
- Guimarães, J. . (2018). *Bio Fermented Colors-Pigmentos de Origem Bacteriana: Uma Alternativa Sustentável no Design de Moda e Têxtil*. Covilhã, Janeiro: UNIVERSIDADE DA BEIRA INTERIOR, Tesis Doctoral.
- Konica Minolta Sensing, Inc. (2022). *Understanding the CIE L*C*h Color Space*. From Konica Minolta Sensing Americas:
<https://sensing.konicaminolta.us/us/blog/understanding-the-cie-lch-color-space/>
- Kordjazi, T., Mariniello, L., Giosafatto, C. V. L., Porta, R., & Restaino, O. F. . (2024). Streptomycetes as microbial cell factories for the biotechnological production of melanin. *International Journal of Molecular Sciences*, , 25(5), 3013.
- Kumar, A., Dixit, U., Singh, K., Gupta, S. P., & Beg, M. S. J. (2021). *Dyes and Pigments - Novel Applications and Waste Treatment*. Londres: IntechOpen.

- Lagashetti, A. C., Dufossé, L., Singh, S. K., & Singh, P. N. . (2019). Fungal pigments and their prospects in different industries. . *Microorganisms*, 7(12), 604.
- Lee, PR., Boo, C.X. & Liu, SQ. . (2013). Fermentation of coconut water by probiotic strains *Lactobacillus acidophilus* L10 and *Lactobacillus casei* L26. *Ann Microbiol*, 63, 1441–1450.
- Lima, A., França, A., Muzny, C. A., Taylor, C. M., & Cerca, N. (2022). DNA extraction leads to bias in bacterial quantification by qPCR. . *Applied microbiology and biotechnology*, 106(24), 7993-8006.
- Llópiz-Arzuaga, A. (2016). Active compounds from cyanobacteria and microalgae: properties and potential applications in biomedicine. . *Bionatura.*, 1 (2), 79–88.
- Magdalena, G. (2016). *ESPECTROMETRÍA DE RADIACIÓN ULTRAVIOLETA VISIBLE (UV/VIS) MATERIAL DE APOYO PARA ASIGNATURA" TEMAS SELECTOS DE QUÍMICA (ANALITICA)"*. CDMX: UNIVERSIDAD AUTONOMA DEL ESTADO DE MÉXICO.
- Marcano, D. (2018). *Introducción a la Química de los colorantes*. Caracas, Venezuela: Academia de Ciencias Físicas, Matemáticas y Naturales.
- McDougald, D., Klebensberger, J., Tolker-Nielsen, T., Webb, J. S., Conibear, T., Rice, S. A., & Kjelleberg, S. (2008). *Pseudomonas aeruginosa*: a model for biofilm formation. *Pseudomonas: model organism, pathogen, cell factory*,. In D. K.-N. McDougald, *Biotechnological Relevance of Pseudomonads* (pp. 215-395). online doi:: 10.1002/9783527622009.
- McGoeven, P., Zhang, J., Tang, J., Zhang, Z., Hall, G. R., Moreau, R. A., Nunez, A., Buttrym E., Richards, M., Wang, C., Cheng, G., Zhao, Z., & Wang, C. (2004). Fermented beverages of pre- and proto-historic China. . *Proceedings of the National Academy of Science*, 101(51), 17593-17598 <https://doi.org/10.1073/pnas.0407921102> .
- Mnif, S., Jardak, M., Bouizgarne, B., & Aifa, S. (2022). Prodigiosin from *Serratia*: Synthesis and potential applications. . *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, , 12(6), 233-242.
- Morales, M. & Escalante, J. (2022). Fenazinas: Mucho color, muchas funciones. <https://acmor.org/publicaciones/fenazinas-mucho-color-muchas-funciones>. From Academia de ciencias de Morelos, México: <https://acmor.org/publicaciones/fenazinas-mucho-color-muchas-funciones>

- Moya, M. &. (2010). Alquimia: Pigmentos y colorantes históricos. *Anales de Química de la RSEQ*, (1), 58-65.
- P. Nishad and R. Manicka Chezian, . (2013). Various colour spaces and colour space conversion algorithms. *Journal of Global Research in Computer Science*, vol. 4, no. 1, pp. 44-48.
- Picado T, C. (1942). El agua de coco como medio de cultivo. . *Boletín de la Oficina Sanitaria Panamericana (OSP)*, 21 (10), 960-966.
- Pierson, L. S., & Pierson, E. A. . (2010). Metabolism and function of phenazines in bacteria: impacts on the behavior of bacteria in the environment and biotechnological processes. . *Applied microbiology and biotechnology*,, 86, 1659-1670.
- Pinto, J., & Rivlin, R. . (2013). Riboflavin (vitamin B2). . *Handbook of vitamins*, , 5, 191-266.
- Powell, W. F. (2012). *1,500 Color Mixing Recipes for Oil, Acrylic & Watercolor: Achieve Precise Color when Painting Landscapes, Portraits, Still Lifes, and More*. China: Walter Foster Publishing Inc.
- Rey, P. (2021, enero 4). Teñidos naturales: la alternativa de color sustentable para tus prendas. *Vougue México y Latinoamérica*, pp. <https://www.vogue.mx/sustentabilidad/articulo/tenidos-naturales-alternativa-de-color-sustentable#:~:text=Los%20te%C3%B1idos%20naturales%20ayudan%20tambi%C3%A9n%20a%20que%20las%20prendas%20sean%20biodegradables%20%2C%20y%20puedan%20regresar%20a%20la%20tier>.
- Rueda, C. (2021). El Sistema Pantone. La importancia de la estandarización del color. *Espacio Diseño*, , (294-295), 30-33.
- Samanta, A. K. (2022). *Colorimetric Evaluations and Characterization of Natural and Synthetic Dyes/Pigments and Dyed Textiles and Related Products*. *Colorimetry*. INTECHOPED LIMITED.
- Sánchez, O. &. (2005). Evaluacion de parametros cineticos para la *Sacharomyces cerevisiae* utilizando agua de coco como sustrato. *Ingenieria Revista de la Universidad de Costa Rica*,, 15(1-2), 91-102.
- Santos-Mendoza, R., Ramos-Vásquez, E., Iris Zavaleta, A., Zúñiga-Dávila, D., & Velezmoro-Sánchez, C. . (2018). Bacterias ácido lácticas productoras de riboflavina aisladas del proceso de elaboración de la " Tunta". *Ecología aplicada*, 17(2), 185-189.

- Schanda, J. (2007). *Colorimetry: understanding the CIE system*. New Jersey: John Wiley & Sons.
- Shokrzadeh, M., & Modanloo, M. . (2017). An overview of the most common methods for assessing cell viability. *J. Res. Med. Dent. Sci.*, 5(2), 33-41.
- Singh, M. Patel, F. & Modi, N. (2020). Effect of mordants on natural dye extracts. . *INTERNATIONAL JOURNAL OF RESEARCH CULTURE SOCIETY*, V.4 pp.109-114.
- Tóth M., Kériné Borsodi E., Felföldi A., Vajna T., Sipos B., & Márialigeti, K. (2013). *Practical Microbiology: based on the Hungarian practical notes entitled" Mikrobiológiai Laboratóriumi Gyakorlatok"*. Budapest: Eötvös Loránd Tudományegyetem.
- Tseng, Y. Y., Chen, M. T., & Lin, C. F. . (2000). Growth, pigment production and protease activity of *Monascus purpureus* as affected by salt, sodium nitrite, polyphosphate and various sugars., . *Journal of Applied Microbiology*, 88(1), 31-37.
- Venil, C. K., Dufossé, L., & Renuka Devi, P. . (2020). Bacterial pigments: sustainable compounds with market potential for pharma and food industry. *Frontiers in Sustainable Food Systems*, (4) 100.
- Wan, Z., Zhu, X., Yang, X., Cheung, W., Wen, H., Ma, S., & Lv, J. . (2018). Pigment expression of *Pseudomonas aeruginosa* on different brands of CN agar. *Journal of Food Safety and Quality*,, 9(21), 5699-5703.
- Wibowo, S. V. (2015). Colour and carotenoid changes of pasteurised orange juice during storage. . *Food chemistry*,, 171, 330-340.
- Zaghloul, M. Y. M., Zaghloul, M. M. Y., & Zaghloul, M. M. Y. . (2021). Developments in polyester composite materials—An in-depth review on natural fibres and nano fillers. . *Composite Structures*, 278, 114698.
- Zhang, L. e. (2023). Hydrogen-bonding and π - π interaction promoted solution-processable covalent organic frameworks. *Nature Communications*,, 14(1), 8181.

XII. Anexos

A. Datos originales

Cuadro 22 Concentración $\pm 1 \times 10^{-10}$ de células P.A./mL en medios de cultivo iniciales

tiempo (h)	α	β	γ
0	0.000319	0.000383	0.000319
2	0.000351	0.052665	0.000351
4	0.000351	2.569422	0.000351
6	0.000383	3.511012	0.04692
8	0.041494	3.830195	2.441749
10	1.595914	5.745292	3.032237
12	2.553463	14.36323	5.521864
14	3.830195	38.30195	10.05426
16	5.745292	121.2895	23.14076
18	7.979572	159.5914	127.6732
20	95.75487	271.3055	933.61
22	1595.914	1595.914	3989.786
24	6383.658	7617.938	7000.798
32	6383.658	7617.94	7000.799
48	6383.658	7617.941	7000.799
72	6383.658	7617.941	7000.799
96	6383.658	7617.941	7000.799

Fuente: Elaboración propia.

El cuadro muestra la concentración de las células viables de P.A. en los medios de cultivo α , β & γ , con las formulaciones referidas al Cuadro 1.

Cuadro 23 Concentración $\pm 1 \times 10^{-10}$ de células P.B./mL en medios de cultivo iniciales

tiempo (h)	α	β	γ
0	3.43997E-05	8.21767E-06	1.10453E-05
2	3.78397E-05	9.03944E-06	1.20494E-05
4	4.12797E-05	9.03944E-06	1.20494E-05
6	4.12797E-05	1.0683E-05	1.20494E-05
8	0.000498796	0.000123265	0.002741239
10	0.003336773	0.000690284	0.051511196
12	0.01369109	0.003311721	0.078220705
14	0.025662195	0.007075414	0.203835726
16	2.373581011	0.523465556	0.357465609
18	14.74716202	3.564825087	0.326337986
20	61.91950464	13.64133159	5.57284868
22	192.6384589	4.560806646	124.5105934
24	447.1964224	101.8991856	201.1246109
32	6535.947712	2383.124194	2490.562245
48	6535.947712	2383.165282	2490.562245
72	6535.947712	2383.20637	2490.562245
96	6535.947712	2383.20637	2490.562245

Fuente: Elaboración propia.

El cuadro muestra la concentración de las células viables de P.B. en los medios de cultivo α , β & γ , con las formulaciones referidas al Cuadro 1.

Cuadro 24 Concentración $\pm 1 \times 10^{-10}$ de células R.a. /mL en medios de cultivo iniciales

tiempo (h)	α	β	Γ
0	0.00028392	1.0983E-05	0.000024
2	0.00031231	1.2979E-05	0.000027
4	0.0003407	1.2979E-05	0.000027
6	0.0003407	1.2979E-05	0.000058
8	0.0041168	0.00034944	0.001187
10	0.02754	0.00103835	0.004238
12	0.11299916	0.00308509	0.008331
14	0.21180245	0.00859633	0.023612
16	19.5903071	0.65096497	0.164923
18	121.715429	3.93174852	8.638211
20	511.051488	1.97755569	4.519035
22	1589.93796	5.99856229	24.774775
24	3690.92742	146.766741	97.549162
32	53944.3238	3092.13351	2889.179502
48	6535.947712	2383.165282	2490.562245
72	6535.947712	2383.20637	2490.562245
96	6535.947712	2383.20637	2490.562245

Fuente: Elaboración propia.

El cuadro muestra la concentración de las células viables de R.a. en los medios de cultivo α , β & γ , con las formulaciones referidas al Cuadro 1.

Cuadro 25 Concentración de cell/mL viables de las bacterias en los medios de cultivo modificando a concentración de nitrógeno

Medio de crecimiento	cepa	Tiempo (h)			
		0 Concentración $\pm 1 \times 10^{-10}$ cell/mL	14 Concentración $\pm 1 \times 10^{-10}$ cell/mL	48 Concentración $\pm 1 \times 10^{-10}$ cell/mL	120 Concentración $\pm 1 \times 10^{-10}$ cell/mL
α 1/4	P.A.	70.0	3300.0	14600.0	14600.0
	P.B.	42.3	130.0	19100.0	19100.0
	R.a.	37.8	4060.0	19100.0	19100.0
β 1/4	P.A.	11.4	2270.0	17300.0	17300.0
	P.B.	12.0	1380.0	27400.0	27400.0
	R.a.	13.0	2880.0	35900.0	35900.0
γ 1/4	P.A.	14.0	248.0	3080.0	3080.0
	P.B.	8.3	266.0	5830.0	5830.0
	R.a.	14.0	234.0	4970.0	4970.0
α 1/2	P.A.	28.0	2240.0	72700.0	72700.0
	P.B.	46.3	3060.0	71900.0	71900.0
	R.a.	14.0	3290.0	74300.0	74300.0
β 1/2	P.A.	74.1	2830.0	65200.0	65200.0
	P.B.	60.5	5240.0	58600.0	58600.0
	R.a.	28.0	2530.0	46600.0	46600.0
γ 1/2	P.A.	13.0	3190.0	38300.0	38300.0
	P.B.	13.0	2770.0	30600.0	30600.0
	R.a.	13.0	2490.0	34700.0	34700.0
α	P.A.	5.6	2240.0	44744.0	44744.0
	P.B.	2.21	3330.0	66578.0	66578.0
	R.a.	5.6	2700.0	53944.0	53944.0
β	P.A.	3.25	2910.0	58167.5	58167.5
	P.B.	1.4	120.0	2386.0	2386.0
	R.a.	5.42	153.0	5114.1	5114.1
γ	P.A.	5.6	138.0	4595.4	4595.4
	P.B.	101.0	126.0	2450.0	2450.0
	R.a.	2.03	146.0	2899.7	2899.7

Fuente: Elaboración propia.

El cuadro muestra la concentración de las células viables de P.A., P.B., & R.a. en los medios de cultivo α , β & γ modificando la concentración de nitrógeno, con las formulaciones referidas al Cuadro 1.

Cuadro 26 Concentración cell/mL en los medios de cultivo modificando a concentración de fósforo y magnesio en el tiempo

Medio de cultivo	Cepa	Tiempo (h)			
		0h	24h	48h	120h
		Concentración $\pm 1 \times 10^{-10}$ cell/mL	Concentración $\pm 1 \times 10^{-10}$ cell/mL	Concentración $\pm 1 \times 10^{-10}$ cell/mL	Concentración $\pm 1 \times 10^{-10}$ cell/mL
α 1.5	P.A.	166.0	223.6	1480.0	1480.0
	P.B.	77.0	148.0	2560.0	2560.0
	R.a.	194.0	280.0	3660.0	3660.0
β 1.5	P.A.	58.8	167.0	2752.0	2752.0
	P.B.	53.3	299.0	1782.0	1782.0
	R.a.	37.8	420.0	802.2	802.2
δ 1.5	P.A.	172.0	388.5	2394.0	2394.0
	P.B.	205.0	435.0	5700.0	5700.0
	R.a.	159.0	234.0	1400.0	1400.0
α 2	P.A.	154.0	219.0	1703.0	1703.0
	P.B.	182.0	419.5	996.0	996.0
	R.a.	56.0	455.0	854.0	854.0
β 2	P.A.	68.0	402.0	1398.4	1398.4
	P.B.	52.0	200.0	2040.0	2040.0
	R.a.	221.0	140.0	142.8	142.8
δ 2	P.A.	79.0	154.0	2570.4	2570.4
	P.B.	87.0	168.0	6135.2	6135.2
	R.a.	76.0	142.0	1985.2	1985.2

Fuente: Elaboración propia.

El cuadro muestra la concentración de las células viables de P.A., P.B., & R.a. en los medios de cultivo modificando la concentración de fósforo (α , β & δ) y magnesio (δ) con las formulaciones referidas al Cuadro 1.

Cuadro 27 Concentración g/mL de nitrógeno en los medios de cultivo modificando a concentración de nitrógeno en el tiempo

Medio	Cepa	Tiempo (h)		
		0 Concentración ± 0.003 g/mL	14 Concentración $\pm 1 \times 10^{-10}$ cell/mL	52 Concentración $\pm 1 \times 10^{-10}$ cell/mL
α	P.A.	1.720	1.400	1.112
	P.B.	1.720	1.120	1.042
	R.a.	1.720	1.100	0.852
$\alpha \frac{1}{2}$	P.A.	0.860	0.698	0.556
	P.B.	0.860	0.561	0.521
	R.a.	0.860	0.552	0.426
$\alpha \frac{1}{4}$	P.A.	0.429	0.349	0.278
	P.B.	0.429	0.281	0.261
	R.a.	0.429	0.276	0.213
β	P.A.	1.730	1.340	0.983
	P.B.	1.730	1.320	1.202
	R.a.	1.730	1.310	1.223
$\beta \frac{1}{2}$	P.A.	0.865	0.670	0.492
	P.B.	0.865	0.660	0.601
	R.a.	0.865	0.654	0.612
$\beta \frac{1}{4}$	P.A.	0.432	0.335	0.246
	P.B.	0.432	0.330	0.300
	R.a.	0.432	0.327	0.306
γ	P.A.	1.610	1.130	0.950
	P.B.	1.610	0.990	0.530
	R.a.	1.610	1.170	0.960
$\gamma \frac{1}{2}$	P.A.	0.803	0.564	0.474
	P.B.	0.803	0.496	0.267
	R.a.	0.803	0.584	0.478
$\gamma \frac{1}{4}$	P.A.	0.402	0.282	0.237
	P.B.	0.402	0.248	0.134
	R.a.	0.402	0.292	0.239

Fuente: Elaboración propia.

Cuadro 28 Concentración g/mL de fosfatos en los medios de cultivo modificando después de 52h

Medio de cultivo	Cepa	Concentración ± 0.05 mg/mL
2 δ	PA	N.a
	PB	62.5
	Ra	N.a
1.5 α	PA	N.a
	PB	N.a
	Ra	27
1.5 β	PA	N.a
	PB	N.a
	Ra	N.a
1.5 δ	PA	36.5
	PB	65
	Ra	56.5
α	PA	N.a
	PB	14.5
	Ra	91
β	PA	30
	PB	N.a
	Ra	N.a
δ	PA	20.5
	PB	N.a
	Ra	N.a

Fuente: Elaboración propia.

B. Datos calculados

Cuadro 29 Concentración cantidades de reactivos en las tres formulaciones originales

Reactivos	Formulaciones 1L			Formulaciones 0.5L		
	α	β	γ	α	β	γ
Sacarosa ($\pm 5 \times 10^{-4}$ g/l)	10	0	0	5	0	0
Lactosa ($\pm 5 \times 10^{-4}$ g/l)	0	10	0	0	5	0
Peptona ($\pm 5 \times 10^{-4}$ g/l)	5	5	2.5	2.5	2.5	1.25
Extracto de levadura ($\pm 5 \times 10^{-4}$ g/l)	3	3	2.5	1.5	1.5	1.25
KH_2PO_4 ($\pm 5 \times 10^{-4}$ g/l)	1.5	1.5	0.5	0.75	0.75	0.25
MgSO_4 ($\pm 5 \times 10^{-4}$ g/l)	1.5	1.5	0.5	0.25	0.75	0.5
Agua destilada ($\pm 5 \times 10^{-4}$ g/l)	1	1	0	0.5	0.5	0
Agua de coco ($\pm 5 \times 10^{-4}$ g/l)	0	0	1	0	0	0.5

Fuente: Elaboración propia.

Cuadro 30 Concentración cantidades de reactivos en las formulaciones con la mitad de nitrógeno

Reactivos	Formulaciones 1L			Formulaciones 0.5L		
	$\alpha \frac{1}{2}$ N	$\beta \frac{1}{2}$ N	$\gamma \frac{1}{2}$ N	$\alpha \frac{1}{2}$ N	$\beta \frac{1}{2}$ N	$\gamma \frac{1}{2}$ N
Sacarosa ($\pm 5 \times 10^{-4}$ g/l)	10	0	0	5	0	0
Lactosa ($\pm 5 \times 10^{-4}$ g/l)	0	10	0	0	5	0
Peptona ($\pm 5 \times 10^{-4}$ g/l)	2.5	2.5	1.25	1.25	1.25	0.625
Extracto de levadura ($\pm 5 \times 10^{-4}$ g/l)	1.5	1.5	1.25	0.75	0.75	0.625
KH_2PO_4 ($\pm 5 \times 10^{-4}$ g/l)	1.5	1.5	0.5	0.75	0.75	0.25
MgSO_4 ($\pm 5 \times 10^{-4}$ g/l)	1.5	1.5	0.5	0.25	0.75	0.5
Agua destilada ($\pm 5 \times 10^{-4}$ g/l)	1	1	0	0.5	0.5	0
Agua de coco ($\pm 5 \times 10^{-4}$ g/l)	0	0	1	0	0	0.5

Fuente: Elaboración propia.

Cuadro 31 Concentración cantidades de reactivos en las formulaciones con un cuarto de nitrógeno

Reactivos	Formulaciones 1L			Formulaciones 0.5L		
	α $\frac{1}{4}$ N	β $\frac{1}{4}$ N	γ $\frac{1}{4}$ N	α $\frac{1}{4}$ N	β $\frac{1}{4}$ N	γ $\frac{1}{4}$ N
Sacarosa ($\pm 5 \times 10^{-4}$ g/l)	5	0	0	5	0	0
Lactosa ($\pm 5 \times 10^{-4}$ g/l)	0	5	0	0	5	0
Peptona ($\pm 5 \times 10^{-4}$ g/l)	1.25	1.25	0.625	0.625	0.625	
Extracto de levadura ($\pm 5 \times 10^{-4}$ g/l)	0.75	0.75	0.625	0.375	0.375	0.313
KH_2PO_4 ($\pm 5 \times 10^{-4}$ g/l)	1.5	1.5	0.5	0.75	0.75	0.25
MgSO_4 ($\pm 5 \times 10^{-4}$ g/l)	1.5	1.5	0.5	0.25	0.75	0.5
Agua destilada ($\pm 5 \times 10^{-4}$ g/l)	0.5	0.5	0	0.5	0.5	0
Agua de coco ($\pm 5 \times 10^{-4}$ g/l)	0	0	0.5	0	0	0.5

Fuente: Elaboración propia.

Cuadro 32 Concentración cantidades de reactivos en las formulaciones con la mitad de nitrógeno y 1.5 veces la concentración inicial de fósforo

Reactivos	Formulaciones 1L			Formulaciones 0.5L		
	α $\frac{1}{2}$ N	β $\frac{1}{2}$ N	δ $\frac{1}{2}$ N	α $\frac{1}{2}$ N	β $\frac{1}{2}$ N	δ $\frac{1}{2}$ N
	1.5P	1.5P	1.5P	1.5P	1.5P	1.5P
Sacarosa ($\pm 5 \times 10^{-4}$ g/l)	10	0	0	5	0	0
Lactosa ($\pm 5 \times 10^{-4}$ g/l)	0	10	10	0	5	5
Peptona ($\pm 5 \times 10^{-4}$ g/l)	2.5	2.5	2.5	1.25	1.25	1.25
Extracto de levadura ($\pm 5 \times 10^{-4}$ g/l)	1.5	1.5	1.5	0.75	0.75	0.75
KH_2PO_4 ($\pm 5 \times 10^{-4}$ g/l)	2.25	2.25	2.25	1.125	1.125	1.125
MgSO_4 ($\pm 5 \times 10^{-4}$ g/l)	1.5	1.5	2.25	0.75	0.75	1.125
Agua destilada ($\pm 5 \times 10^{-4}$ g/l)	1	1	1	0.5	0.5	0.5
Agua de coco ($\pm 5 \times 10^{-4}$ g/l)	10	0	0	5	0	0

Fuente: Elaboración propia.

Cuadro 33 Concentración cantidades de reactivos en las formulaciones con un cuarto de nitrógeno y el doble de la concentración inicial de fósforo

Reactivos	Formulaciones 1L			Formulaciones 0.5L		
	α ½ N	β ½ N	δ ½ N	α ½ N	β ½ N	δ ½ N
	2 P	2 P	2P	2P	2P	2 P
Sacarosa ($\pm 5 \times 10^{-4}$ g/l)	10	0	0	5	0	0
Lactosa ($\pm 5 \times 10^{-4}$ g/l)	0	10	10	0	5	5
Peptona ($\pm 5 \times 10^{-4}$ g/l)	2.5	2.5	2.5	1.25	1.25	1.25
Extracto de levadura ($\pm 5 \times 10^{-4}$ g/l)	1.5	1.5	1.5	0.75	0.75	0.75
KH ₂ PO ₄ ($\pm 5 \times 10^{-4}$ g/l)	3	3	3	1.5	1.5	1.5
MgSO ₄ ($\pm 5 \times 10^{-4}$ g/l)	1.5	1.5	2.25	0.75	0.75	1.125
Agua destilada ($\pm 5 \times 10^{-4}$ g/l)	1	1	1	0.5	0.5	0.5
Agua de coco ($\pm 5 \times 10^{-4}$ g/l)	10	0	0	5	0	0

Fuente: Elaboración propia.

Cuadro 34 Valores CieL*a*b y valor del vectorial del color para P.A.

Formulación	Valores CieL*a*b			Vector
	L (± 0.05)	a (± 0.05)	b (± 0.05)	$ \vec{v} $
caldo nutritivo	31.03	21.01	39.97	45.21
α	53.00	6.04	44.00	30.85
β	56.00	5.00	49.99	24.77
γ	52.00	8.05	55.00	23.88
α 1/2 N	51.00	-1.00	25.97	42.76
α 1/4 N	54.00	-2.02	20.00	42.38
β 1/2 N	50.95	1.00	27.00	42.33
β 1/4 N	50.00	0.02	14.00	48.08
γ 1/2 N	47.03	0.02	17.04	49.98
γ 1/4 N	53.00	-0.95	10.00	46.06
α 1/2 N 1.5P	48	1.04	31	42.85
α 1/2 N 2P	29	1.01	25	61.70
β 1/2 N 1.5P	47	1.04	27	45.79
β 1/2 N 2P	40.98	3	28	50.28
γ 1/2 N 1.5P	36	-1.04	16	60.59
γ 1/2 N 2P	40	0.02	22.05	54.33

Fuente: Elaboración propia.

Las formulaciones presentes en este cuadro están referidas al Cuadro 1 y/o a los cuadros 29-33.

Cuadro 35 Valores Ciel*a*b y valor del vectorial del color para P.B.

Formulación	Valores Ciel*a*b			Vector
	L (± 0.05)	a (± 0.05)	b (± 0.05)	$ \vec{v} $
caldo nutritivo	31.03	21.01	39.97	45.21
α	61.00	2.01	42.10	25.86
β	61.00	3.99	48.00	22.28
γ	51.00	10.00	57.06	22.82
$\alpha 1/2$ N	57.00	-1.05	27.05	36.90
$\alpha 1/4$ N	55.02	0.02	9.99	44.08
$\beta 1/2$ N	33.00	-7.02	9.00	65.08
$\beta 1/4$ N	49.00	1.00	7.03	50.49
$\gamma 1/2$ N	46.98	-1.00	14.02	50.96
$\gamma 1/4$ N	48.02	-1.00	8.01	51.31
$\alpha 1/2$ N 1.5P	45	-3	23	49.37
$\alpha 1/2$ N 2P	49.97	0.02	28	42.72
$\beta 1/2$ N 1.5P	51.02	1.02	20	45.19
$\beta 1/2$ N 2P	48	1.01	18	48.73
$\gamma 1/2$ N 1.5P	35	-1.01	15	61.91
$\gamma 1/2$ N 2P	34	-6	19	60.59

Fuente: Elaboración propia.

Las formulaciones presentes en este cuadro están referidas al Cuadro 1 y/o a los cuadros 29-33.

Cuadro 36 Valores Ciel*a*b y valor del vectorial del color para R.a.

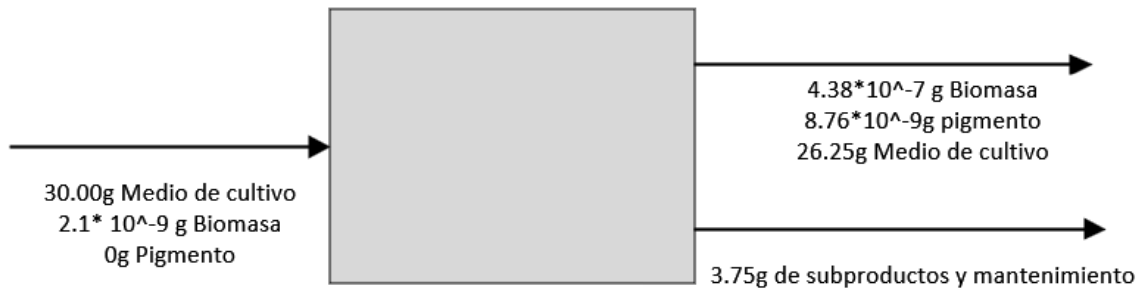
Formulación	Valores Ciel*a*b			Vector
	L (± 0.05)	a (± 0.05)	b (± 0.05)	$ \vec{v} $
caldo nutritivo	31.03	21.01	39.97	45.21
α	60.00	3.00	47.02	23.71
β	57.00	6.04	52.98	21.95
γ	56.00	6.04	54.00	21.97
$\alpha 1/2$ N	52.98	1.03	20.04	43.35
$\alpha 1/4$ N	55.00	0.02	13.01	43.48
$\beta 1/2$ N	43.00	-3.00	23.00	51.14
$\beta 1/4$ N	52.02	1.01	18.00	44.94
$\gamma 1/2$ N	50.00	0.02	15.97	47.51
$\gamma 1/4$ N	51.02	-1.00	9.98	48.00
$\alpha 1/2$ N 1.5P	40	9.02	27	50.90
$\alpha 1/2$ N 2P	45	4	27	47.37
$\beta 1/2$ N 1.5P	49.99	-1	26	43.64
$\beta 1/2$ N 2P	39	-1.05	19	56.61
$\gamma 1/2$ N 1.5P	35	-6	26	55.99
$\gamma 1/2$ N 2P	32	-5	19	62.45

Fuente: Elaboración propia.

Las formulaciones presentes en este cuadro están referidas al Cuadro 1 y/o a los cuadros 29-33.

C. Balance de masa

Figura 45. Balance de masa para la producción de biopigmento



Fuente: Elaboración propia.

*Balance obtenido para fermentaciones a 35°C para un volumen de 30 mL durante 52 horas. El balance del ejemplo se realizó para la formulación α N/4 para la cepa P.A.

Cuadro 37 Balance de masa para los diferentes medios de cultivo modificado la cantidad de nitrógeno

Balance de masa							
Medio de crecimiento	Entrada			Salida			
	Medio de cultivo ($\pm 5 \times 10^{-4}$ g)	Biomasa ($\pm 5 \times 10^{-10}$ g)	Biomasa ($\pm 5 \times 10^{-10}$ g)	Mantenimiento y subproductos ($\pm 5 \times 10^{-4}$ g)	Pigmento ($\pm 5 \times 10^{-12}$ g)	Medio de cultivo ($\pm 5 \times 10^{-4}$ g)	
α N/4	30	2.1E-09	0.000000438	7.5	8.8E-09	22.50	
	30	1.269E-09	0.000000573	7.5	1.1E-08	22.50	
	30	1.134E-09	0.000000573	7.5	1.1E-08	22.50	
β N/4	30	3.42E-10	0.000000519	7.5	1.0E-08	22.50	
	30	3.6E-10	0.000000822	7.5	1.6E-08	22.50	
	30	3.9E-10	0.000001077	7.5	2.2E-08	22.50	
γ N/4	30	4.2E-10	9.24E-08	7.5	1.8E-09	22.50	
	30	2.49E-10	1.749E-07	7.5	3.5E-09	22.50	
	30	4.2E-10	1.491E-07	7.5	3.0E-09	22.50	
α N/2	30	8.4E-10	0.000002181	7.5	4.4E-08	22.50	
	30	1.389E-09	0.000002157	7.5	4.3E-08	22.50	
	30	4.2E-10	0.000002229	7.5	4.5E-08	22.50	
β N/2	30	2.223E-09	0.000001956	7.5	3.9E-08	22.50	
	30	1.815E-09	0.000001758	7.5	3.5E-08	22.50	
	30	8.4E-10	0.000001398	7.5	2.8E-08	22.50	
γ N/2	30	3.9E-10	0.000001149	7.5	2.3E-08	22.50	
	30	3.9E-10	0.000000918	7.5	1.8E-08	22.50	
	30	3.9E-10	0.000001041	7.5	2.1E-08	22.50	
α N	30	1.68E-10	1.34232E-06	7.5	2.7E-08	22.50	
	30	6.63E-11	1.99734E-06	7.5	4.0E-08	22.50	
	30	1.68E-10	1.61832E-06	7.5	3.2E-08	22.50	
β N	30	9.75E-11	1.74503E-06	7.5	3.5E-08	22.50	
	30	4.2E-11	7.158E-08	7.5	1.4E-09	22.50	
	30	1.626E-10	9.0174E-08	7.5	1.8E-09	22.50	
γ N	30	1.68E-10	8.112E-08	7.5	1.6E-09	22.50	
	30	3.03E-09	7.35E-08	7.5	1.5E-09	22.50	
	30	6.09E-10	8.6991E-08	7.5	1.7E-09	22.50	

Fuente: Elaboración propia.

Las formulaciones presentes en este cuadro están referidas al Cuadro 1 y/o a los cuadros 29-33.

Cuadro 38 Balance de masa para los medios de cultivo modificado la cantidad de fósforo.

Balance de masa						
Medio de crecimiento	Entrada			Salida		
	Caldo de cultivo ($\pm 5 \times 10^{-4}$ g)	Biomasa ($\pm 5 \times 10^{-10}$ g)	Biomasa ($\pm 5 \times 10^{-10}$ g)	Pigmento ($\pm 5 \times 10^{-12}$ g)	Mantenimiento y subproductos ($\pm 5 \times 10^{-4}$ g)	Solución con pigmento ($\pm 5 \times 10^{-4}$ g)
α 1.5 P	30	4.98E-09	4.4E-08	8.9E-10	7.5	22.50
	30	2.31E-09	7.7E-08	1.5E-09	7.5	22.50
	30	5.82E-09	1.1E-07	2.2E-09	7.5	22.50
β 1.5 P	30	1.764E-09	8.3E-08	1.7E-09	7.5	22.50
	30	1.599E-09	5.3E-08	1.1E-09	7.5	22.50
	30	1.134E-09	2.4E-08	4.8E-10	7.5	22.50
δ 1.5 P	30	5.16E-09	7.2E-08	1.4E-09	7.5	22.50
	30	6.15E-09	1.7E-07	3.4E-09	7.5	22.50
	30	4.77E-09	4.2E-08	8.4E-10	7.5	22.50
α 2 P	30	4.62E-09	5.1E-08	1.0E-09	7.5	22.50
	30	5.46E-09	3.0E-08	6.0E-10	7.5	22.50
	30	1.68E-09	2.6E-08	5.1E-10	7.5	22.50
β 2 P	30	2.04E-09	4.2E-08	8.4E-10	7.5	22.50
	30	1.56E-09	6.1E-08	1.2E-09	7.5	22.50
	30	6.63E-09	4.3E-09	8.6E-11	7.5	22.50
δ 2 P	30	2.37E-09	7.7E-08	1.5E-09	7.5	22.50
	30	2.61E-09	1.8E-07	3.7E-09	7.5	22.50
	30	2.28E-09	6.0E-08	1.2E-09	7.5	22.50

Fuente: Elaboración propia.

Las formulaciones presentes en este cuadro están referidas al Cuadro 1 y/o a los cuadros 29-33.

D. Cálculos muestra

Ecuación 1 Cálculo de glucosa y lactosa para medio de cultivo

$$\begin{aligned}C1V2 &= C2V1 \\C2 &= \frac{C1V1}{V2} \\6g &= \frac{10g * 0,6l}{1l}\end{aligned}$$

Donde:

$C1$ = *Concentración inicial*

$C2$ = *Concentración final*

$V1$ = *Volumen inicial*

$V2$ = *Volumen final*

Este cálculo se realizó para encontrar la cantidad de glucosa y lactosa en todos los medios de cultivo formulados.

Ecuación 2 Cálculo de extracto de levadura

$$\begin{aligned}C1V2 &= C2V1 \\C2 &= \frac{C1V1}{V2} \\1,8g &= \frac{3g * 0,6l}{1l}\end{aligned}$$

Donde:

$C1$ = *Concentración inicial*

$C2$ = *Concentración final*

$V1$ = *Volumen inicial*

$V2$ = *Volumen final*

Este cálculo se realizó para encontrar la cantidad de extracto de levadura en todos los medios de cultivo formulados.

Ecuación 3 Cálculo de peptona

$$\begin{aligned}C1V2 &= C2V1 \\C2 &= \frac{C1V1}{V2} \\3g &= \frac{5g * 0,6l}{1l}\end{aligned}$$

Donde:

$C1$ = *Concentración inicial*

$C2$ = *Concentración final*

$V1$ = *Volumen inicial*

$V2$ = *Volumen final*

Este cálculo se realizó para encontrar la cantidad de extracto de levadura en todos los medios de cultivo formulados.

Ecuación 4 Cálculo de KH_2PO_4

$$\begin{aligned}C1V2 &= C2V1 \\C2 &= \frac{C1V1}{V2} \\0.9g &= \frac{1.5g * 0,6l}{1l}\end{aligned}$$

Donde:

$C1$ = *Concentración inicial*

$C2$ = *Concentración final*

$V1$ = *Volumen inicial*

$V2$ = *Volumen final*

Este cálculo se realizó para encontrar la cantidad de extracto de KH_2PO_4 en todos los medios de cultivo formulados.

Ecuación 5 Cálculo de MgSO₄

$$\begin{aligned}C_1V_2 &= C_2V_1 \\C_2 &= \frac{C_1V_1}{V_2} \\0.9g &= \frac{1.5g * 0,6l}{1l}\end{aligned}$$

Donde:

C₁ = Concentración inicial

C₂ = Concentración final

V₁ = Volumen inicial

V₂ = Volumen final

Este cálculo se realizó para encontrar la cantidad de extracto de KH₂PO₄ en todos los medios de cultivo formulados

Ecuación 6 Cálculo de la magnitud de un vector

$$|\vec{v}| = \sqrt{L^2 + a^2 + b^2}$$

Donde:

|\vec{v}| = magnitud del vector

L = luminosidad

a = coordenadas rojo/verde (+*a* indica rojo, -*a* indica verde)

b = coordenadas amarillo/azul (+*b* indica amarillo, -*b* indica azul)

$$|\vec{v}| = \sqrt{53.00^2 + 6.04^2 + 44.00^2} = 30.85$$

Este cálculo se realizó para encontrar la magnitud de los vectores del espacio CIEL*a*b y con ello poder realizar la estadística de este trabajo de graduación, esto debido a que el programa solo aceptaba un valor numérico como respuesta para realizar el análisis factorial.

Ecuación 7 Cálculo de % de error

$$\%error = \left| \frac{ve - vt}{vt} \right| * 100\%$$

Donde:

ve = valor experimental

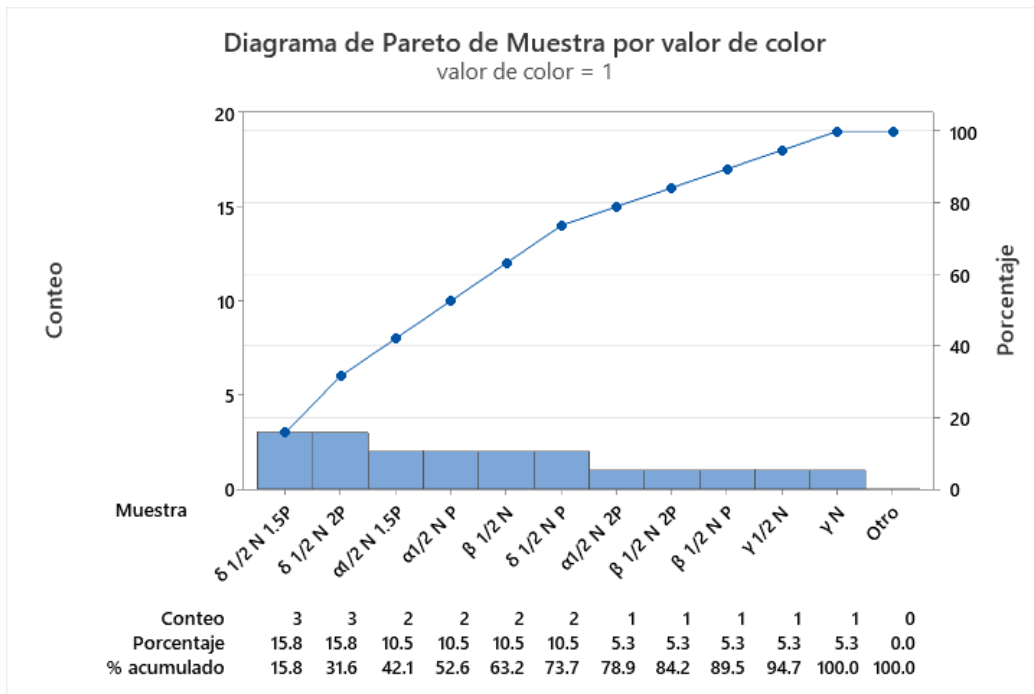
vt = valor teorico

$$8.84\% = \left| \frac{72.84 - 66.92}{66.92} \right| * 100\%$$

Este cálculo se realizó para encontrar el porcentaje de error entre los valores de los vectores al comparar los colores obtenidos con el biopigmento vs el color obtenido con el pigmento comercial.

E. Estadística

Figura 46 Diagrama de Pareto para medios de cultivo que producen pigmento



Fuente: Elaboración propia.

El diagrama de Pareto muestra la formación de pigmento en los medios descritos en la Figura 45, su frecuencia y el porcentaje acumulado.

Estadística para P.A.

Ecuación 8 Ecuación de regresión en unidades no codificadas para P.A.

$$R = 45.21 - 42.2 A - 21.7 B + 2.3 C - 32.81 N - 12.5 P + 24.1 Mg + 17.1 A*N + 32.2 A*P + 1.1 B*N + 21.8 B*P$$

Fuente: Elaboración propia.

La ecuación fue obtenida al realizar un análisis factorial DOE en el software de Minitab

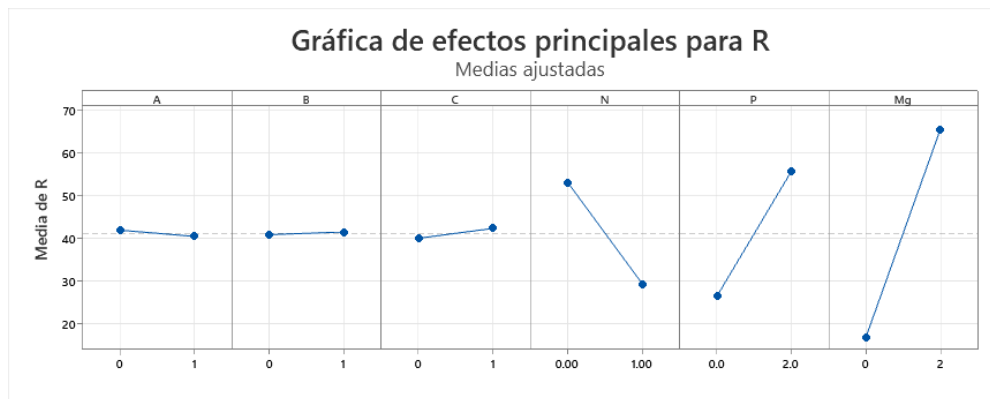
Cuadro 39 Resumen del modelo para fermentaciones de P.A.

R-	S cuadrado
5.37474	91.74%

Fuente: Elaboración propia.

Los valores para el modelo de la ecuación 7 fueron obtenidos al realizar un análisis factorial DOE en el software de Minitab

Figura 47 Gráficas factoriales para resultados de las fermentaciones de P.A.



Fuente: Elaboración propia.

La figura muestra el comportamiento de la producción de pigmentos asociado a las concentraciones de nutrientes en los medios para la cepa P.A.

Estadística para P.B.

Ecuación 9 Ecuación de regresión en unidades no codificadas para P.B.

$$R = 45.2 - 19.4 A + 9.7 B + 4.7 C - 40.6 N - 2.6 P + 18.2 Mg + 15.6 A*N + 10.0 A*P - 3.4 B*N + 0.8 B*P$$

Fuente: Elaboración propia.

La ecuación fue obtenida al realizar un análisis factorial DOE en el software de Minitab

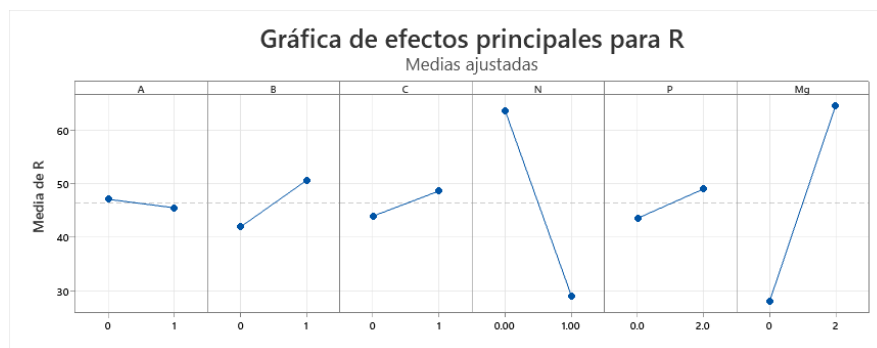
Cuadro 40 Resumen del modelo para fermentaciones de P.B.

R- S cuadrado	
9.99870	80.13%

Fuente: Elaboración propia.

Los valores para el modelo de la ecuación 8 fueron obtenidos al realizar un análisis factorial DOE en el software de Minitab

Figura 48 Gráficas factoriales para resultados de las fermentaciones de P.B.



Fuente: Elaboración propia.

La figura muestra el comportamiento de la producción de pigmentos asociado a las concentraciones de nutrientes en los medios para la cepa P.B.

Estadística para R.a

Ecuación 10 Ecuación de regresión en unidades no codificadas para R.a.

$$R = 45.21 - 7.8 A - 7.0 B - 4.6 C - 37.0 N + 12.9 P + 7.3 Mg + 8.0 A*N - 2.9 A*P + 3.0 B*N + 0.1 B*P$$

Fuente: Elaboración propia.

La ecuación fue obtenida al realizar un análisis factorial DOE en el software de Minitab

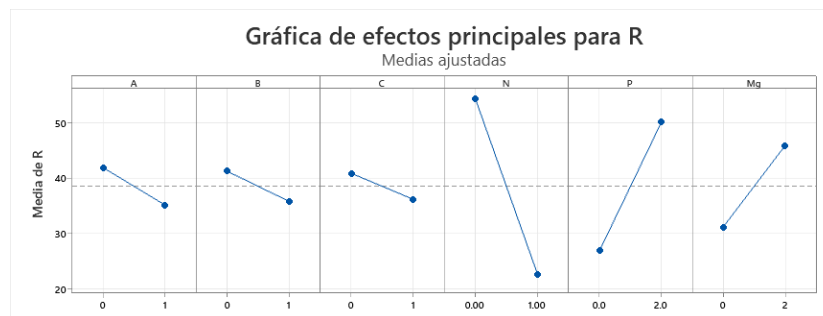
Cuadro 41 Resumen del modelo para fermentaciones de R.a.

S	R-cuadrado
7.23484	87.92%

Fuente: Elaboración propia.

Los valores para el modelo de la ecuación 9 fueron obtenidos al realizar un análisis factorial DOE en el software de Minitab

Figura 49 Gráficas factoriales para resultados de las fermentaciones de R.a.



Fuente: Elaboración propia.

La figura muestra el comportamiento de la producción de pigmentos asociado a las concentraciones de nutrientes en los medios para la cepa R.a.

F. Costos por formulación

Cuadro 42 Costo de fabricación del medio de cultivo α

Materia Prima	Precio del mercado	Contenido	Cantidad utilizada	Precio de formulación
Sacarosa	Q 17.45	2000 g	10 g	Q 0.09
Peptona	Q 725.58	500 g	5 g	Q 7.26
Extracto de levadura	Q14,044.00	25000 g	3 g	Q 1.69
KH ₂ PO ₄	Q 289.00	907.185 g	1.5 g	Q 0.48
MgSO ₄	Q 13.00	453.592 g	1.5 g	Q 0.04
Agua	Q 22.00	18.9 l	1 l	Q 1.16
Total				Q10.17

Fuente: Elaboración propia.

El cuadro muestra las materias primas, el precio y la cantidad de esta en el mercado y la cantidad necesaria de cada materia prima para la producción de 1L de medio de cultivo.

Cuadro 43 Costo de fabricación del medio de cultivo α 1/2N

Materia Prima	Precio del mercado	Contenido	Cantidad utilizada	Precio de formulación
Sacarosa	Q 17.45	2000 g	10 g	Q 0.09
Peptona	Q 725.58	500 g	2.5 g	Q3.63
Extracto de levadura	Q14,044.00	25000 g	1.5 g	Q0.84
KH ₂ PO ₄	Q 289.00	907.185 g	1.5 g	Q0.48
MgSO ₄	Q 13.00	453.592 g	1.5 g	Q0.04
Agua	Q 22.00	18.9 l	1 l	1.16
Total				Q6.24

Fuente: Elaboración propia.

El cuadro muestra las materias primas, el precio y la cantidad de esta en el mercado y la cantidad necesaria de cada materia prima para la producción de 1L de medio de cultivo.

Cuadro 44 Costo de fabricación del medio de cultivo α 1/2N2P

Materia Prima	Precio del mercado	Contenido	Cantidad utilizada	Precio de formulación
Sacarosa	Q 17.45	2000 g	10 g	Q 0.09
Peptona	Q 725.58	500 g	2.5 g	Q3.63
Extracto de levadura	Q14,044.00	25000 g	1.5 g	Q0.84
KH ₂ PO ₄	Q 289.00	907.185 g	3 g	Q 0.96
MgSO ₄	Q 13.00	453.592 g	1.5 g	Q0.09
Agua	Q 22.00	18.9 l	1 l	Q1.16
Total				Q 6.72

Fuente: Elaboración propia.

El cuadro muestra las materias primas, el precio y la cantidad de esta en el mercado y la cantidad necesaria de cada materia prima para la producción de 1L de medio de cultivo.

Cuadro 45 Costo de fabricación del medio de cultivo β

Materia Prima	Precio del mercado	Contenido	Cantidad utilizada	Precio de formulación
Lactosa	Q 17.45	2000 g	10 g	Q 0.20
Peptona	Q 725.58	500 g	5 g	Q 7.26
Extracto de levadura	Q14,044.00	25000 g	3 g	Q 1.69
KH ₂ PO ₄	Q 289.00	907.185 g	1.5 g	Q 0.48
MgSO ₄	Q 13.00	453.592 g	1.5 g	Q 0.04
Agua	Q 22.00	18.9 l	1 l	Q 1.16
Total				Q10.83

Fuente: Elaboración propia.

El cuadro muestra las materias primas, el precio y la cantidad de esta en el mercado y la cantidad necesaria de cada materia prima para la producción de 1L de medio de cultivo.

Cuadro 46 Costo de fabricación del medio de cultivo β 1/2N

Materia Prima	Precio del mercado	Contenido	Cantidad utilizada	Precio de formulación
Lactosa	Q 17.45	2000 g	10 g	Q 0.20
Peptona	Q 725.58	500 g	2.5 g	Q3.63
Extracto de levadura	Q14,044.00	25000 g	1.5 g	Q0.84
KH ₂ PO ₄	Q 289.00	907.185 g	1.5 g	Q0.48
MgSO ₄	Q 13.00	453.592 g	1.5 g	Q0.04
Agua	Q 22.00	18.9 l	1 l	1.16
Total				Q6.36

Fuente: Elaboración propia.

El cuadro muestra las materias primas, el precio y la cantidad de esta en el mercado y la cantidad necesaria de cada materia prima para la producción de 1L de medio de cultivo.

Cuadro 47 Costo de fabricación del medio de cultivo β 1/2N2P

Materia Prima	Precio del mercado	Contenido	Cantidad utilizada	Precio de formulación
Lactosa	Q 17.45	2000 g	10 g	Q 0.20
Peptona	Q 725.58	500 g	2.5 g	Q3.63
Extracto de levadura	Q14,044.00	25000 g	1.5 g	Q0.84
KH ₂ PO ₄	Q 289.00	907.185 g	3 g	Q 0.96
MgSO ₄	Q 13.00	453.592 g	1.5 g	Q0.09
Agua	Q 22.00	18.9 l	1 l	Q1.16
Total				Q 6.83

Fuente: Elaboración propia.

El cuadro muestra las materias primas, el precio y la cantidad de esta en el mercado y la cantidad necesaria de cada materia prima para la producción de 1L de medio de cultivo.

Cuadro 48 Costo de fabricación del medio de cultivo γ

Materia Prima	Precio del mercado	Contenido	Cantidad utilizada	Precio de formulación
Agua de coco	Q 3.75	1 l	1 l	Q 3.75
Peptona	Q725.58	500 g	2.5 g	Q 3.63
Extracto de levadura	Q 14,044.00	25000 g	2.5 g	Q 1.40
KH ₂ PO ₄	Q 289.00	907.185 g	0.5 g	Q 0.16
MgSO ₄	Q 13.00	453.592 g	0.5 g	Q 0.01
Total				Q 8.96

Fuente: Elaboración propia.

El cuadro muestra las materias primas, el precio y la cantidad de esta en el mercado y la cantidad necesaria de cada materia prima para la producción de 1L de medio de cultivo.

Cuadro 49 Costo de fabricación del medio de cultivo γ 1/2N

Materia Prima	Precio del mercado	Contenido	Cantidad utilizada	Precio de formulación
Agua de coco	Q 3.75	1 l	1 l	Q 3.75
Peptona	Q725.58	500 g	1.25 g	Q 1.81
Extracto de levadura	Q 14,044.00	25000 g	1.25 g	Q 0.70
KH ₂ PO ₄	Q 289.00	907.185 g	0.5 g	Q 0.16
MgSO ₄	Q 13.00	453.592 g	0.5 g	Q 0.01
Total				Q 6.44

Fuente: Elaboración propia.

El cuadro muestra las materias primas, el precio y la cantidad de esta en el mercado y la cantidad necesaria de cada materia prima para la producción de 1L de medio de cultivo.

Cuadro 50 Costo de fabricación del medio de cultivo δ 1/2N2P

Materia Prima	Precio del mercado	Contenido	Cantidad utilizada	Precio de formulación
Lactosa	Q 17.45	2000 g	10 g	Q 0.20
Peptona	Q 725.58	500 g	2.5 g	Q3.63
Extracto de levadura	Q14,044.00	25000 g	1.5 g	Q0.84
KH ₂ PO ₄	Q 289.00	907.185 g	3 g	Q 0.96
MgSO ₄	Q 13.00	453.592 g	3 g	Q0.09
Agua	Q 22.00	18.9 l	1 l	Q1.16
Total				Q 6.88

Fuente: Elaboración propia.

El cuadro muestra las materias primas, el precio y la cantidad de esta en el mercado y la cantidad necesaria de cada materia prima para la producción de 1L de medio de cultivo.

G. Especificaciones de los equipos utilizados

Cuadro 51 Especificaciones de los equipos utilizados

Nombre del equipo	Marca	Modelo	Capacidad	Voltaje	Diferencial de presión
Autoclave	Tuttnauer	1840ELVP-WR-D	31L	230 V	2.8 bar
Incubadora	Lab-Line Instruments INC.	310	317 L	120 V	N/a
MUSE	Merck Milpore	Cell Analyzer	10,000-500,000 cell /mL & 2 mL	120 V	N/a
HATCH	HACH	DR900	0.120 L	N/A	N/a
Balanza analítica	OHAUS	AX85	0,00001 g - 82g	120V	N/a
Secador	VWR	Heratherm™ general protocol oven, coated steel	176 L	120 V	N/a
Colorímetro	Konica Minolta	CM-26d	360 a 740 nm	120 V	N/a
Unidad de destilación	Büchi	K-360	1L	120 V	N/a
Scruber	Büchi	K-45	3 L	120 V	50-400 mbar

Fuente: Elaboración propia.

El cuadro muestra los equipos más importantes utilizados en la experimentación de este estudio

H. Microorganismos utilizados

Cuadro 52 Características de los microorganismos utilizados

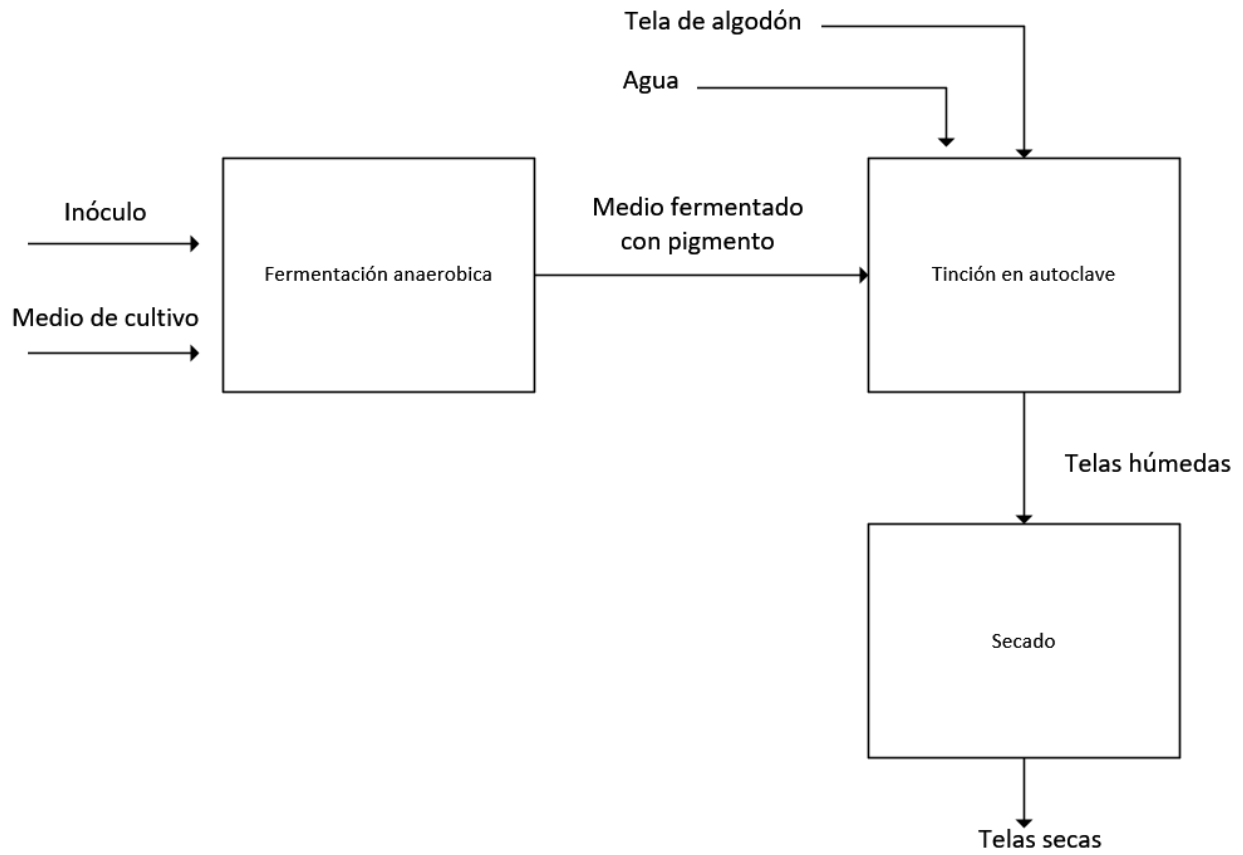
Característica	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>Pseudomonas putida</i>	<i>Rhodococcus equi</i>
Morfología	Bacilo Gram negativo	Bacilo Gram negativo	Coco bacilo Gram positivo
Nivel de Bioseguridad	BSL2	BSL2	BSL2
Hábitat natural	Suelo, agua, flora humana	Suelo, agua	Suelo, agua
Enfermedades que pueden causar	Infecciones nosocomiales, neumonía, infecciones del tracto urinario	Oportunista en humanos, degradación de contaminantes	Neumonía en potros
Resistencia a antibióticos	Alta a muchos antibióticos	Baja a muchos antibióticos	Resistencia variable
Medidas de seguridad	Trabajar en cabina de bioseguridad, utilizar EPP (bata, guantes, mascarilla), desinfectar superficies de trabajo.		
Procedimiento en caso de exposición cutánea	Lavar inmediatamente con abundante agua y jabón. Descontaminar la zona con un antiséptico.		
Procedimiento en caso de exposición ocular	Lavar inmediatamente con abundante agua durante al menos 15 minutos. Acudir al médico.		
Procedimiento en caso de inhalación	Trasladar a la persona a un lugar con aire fresco. Si los síntomas persisten, buscar atención médica.		
Procedimiento en caso de ingestión	No inducir el vómito. Acudir al médico inmediatamente.		

Fuente: Elaboración propia.

El cuadro presenta las características principales y los procedimientos en caso de emergencia para las 3 cepas utilizadas al no ser estos microorganismos GRAS.

I. Esquema del proceso de producción y tinción

Figura 50 Diagrama de bloques del proceso de producción y tinción



Fuente: Elaboración propia.

*Las condiciones de metodología detallada se encuentran en la sección Metodología