

“EVALUACIÓN DE SOPORTES SÓLIDOS Y LÍQUIDOS, PARA LA PRODUCCIÓN DE UN BIOFERTILIZANTE A BASE DE *Azospirillum* spp. APLICABLE AL CULTIVO DE MAÍZ (*Zea mays*, L.)”

Yolanda Pallo^{1/} y Ramiro Velastegui^{2/}

¹Ing. Bioq. UTA. Tesista 2011. Departamento de Maíz, Estación Experimental Santa Catalina, Instituto Nacional Autónomo de Investigaciones Agropecuarias (INIAP), Panamericana Sur Km 1, Quito - Ecuador, E-mail: yoly.pallo.b@hotmail.com

²PhD, Profesor de la Carrera de Ingeniería Bioquímica, Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos, Universidad Técnica de Ambato, Campus Huachi: Av. Los Chasquis y Río Payamino. Ambato – Ecuador, E-mail: rvelastegui@yahoo.com

RESUMEN

Los biofertilizantes tienen como principio activo microorganismos con la capacidad de influenciar positivamente el crecimiento de las plantas, como es el caso del género *Azospirillum*. Para integrar la bacteria al cultivo, es necesario un medio que le brinde protección y los requerimientos necesarios que la mantengan viable desde el momento de la producción del biofertilizante hasta su aplicación en campo, por lo cual se realizó la evaluación de soportes sólidos y líquidos, para la producción de un biofertilizante a base de la cepa C2-Bolívar de *Azospirillum* spp. aplicable al cultivo de maíz.

Los soportes sólidos empleados fueron: Turba de Chimborazo, Mezcla (Turba de Chimborazo + 1% CaCO₃ + 3% raíz de maíz), Turba con vermiculita, Humus de lombriz, Zeolita y Perlas de alginato, mientras que los soportes líquidos estuvieron conformados por soluciones de: Carboximetilcelulosa, Medio ácido málico-rojo congo, Caldo nutritivo, Medio NFB, Melaza y solución aproximada a un biofertilizante comercial. Se evaluaron doce tratamientos, los cuales estuvieron constituidos por los seis soportes sólidos y seis líquidos, inoculados con la cepa C2-Bolívar de *Azospirillum* spp. se almacenaron a temperatura ambiente durante 180 días, en fundas de aluminio polietileno selladas, con 30 ml del producto cada una.

De acuerdo al análisis estadístico, a los 180 días de almacenamiento, el soporte sólido que mantiene mayor concentración bacteriana es t3: turba con vermiculita, con 5.52x10⁸ UFC.g⁻¹. Con respecto al soporte líquido, el tratamiento con mayor población bacteriana es t11: Solución de melaza al 2%, con una concentración de 3.86x10⁸ UFC.ml⁻¹. Un factor determinante, para la selección del mejor soporte, fue el costo de producción, es así que, se descartó la turba con vermiculita, a pesar de ser en la que se alcanzó una mayor concentración bacteriana, puesto que, el costo de producción de 30 ml de biofertilizante fue de 2.11 dólares, y se eligió como mejor soporte sólido a las perlas de alginato con un costo de producción de 1.63 dólares y alternativamente a la mezcla (T. Chimborazo + 1% CaCO₃ + 3% raíz de maíz) con un costo de producción de 1.65 dólares. Como soporte líquido se seleccionó a la solución de melaza al 2%, con un costo de producción de 1.10 dólares la funda de 30 ml de producto. En cuanto al pH y porcentaje de materia orgánica en los tratamientos seleccionados, no existe un cambio altamente significativo durante el almacenamiento.

Palabras clave: Biofertilizante, *Azospirillum* spp., soportes sólidos y líquidos, almacenamiento, concentración bacteriana.

SUMMARY

The biofertilizers have microorganisms as active ingredients with the capacity to influence the growth of plants positively, for instance the genus *Azospirillum*. To integrate the bacteria to the crop, it is necessary to use a media that offers it protection and the requirements that maintain it viable from the biofertilizer preparation until their application in the field. That is why two supports solids and liquids were assessed in order to prepare a biofertilizer based on *Azospirillum* spp. to apply to the corn crop.

The solid supports used were: Peat from Chimborazo, Mixture (peat from Chimborazo + 1% CaCO₃ + 3% corn roots), Peat with vermiculite, Worm humus, Zeolite and Alginate pearls, while the liquid supports were solutions of: Carboxymethylcellulose, Congo red-malic acid media, Nutrient broth, NFB media, molasses and a solution similar to a commercial biofertilizer. Twelve treatments were evaluated, the six solid supports and the six liquid supports, inoculated with a strain C2-Bolivar of *Azospirillum* spp. and they were stored at air temperature during 180 days within aluminum polyethylene bags containing each 30 ml.

According to statistical analysis, at 180 days of storage, the solid support that maintains greater bacterial concentration was t3: peat with vermiculite, with 5.52 x10⁸ UFC.g⁻¹. In the liquid support, the treatment with more bacterial population is t11: solution of molasses 2%, with a concentration of 3.86x10⁸ UFC.ml⁻¹. The cost of the treatments was a very important factor, because of this peat with vermiculite was discarded, although the bacterial concentration was high but the cost of 30 ml of biofertilizer was 2.11 dollars. The best solid support was alginate pearls with a production cost of 1.63 dollars and also the mixture peat from Chimborazo + 1% CaCO₃ + 3% corn roots) with a production cost of 1.65 dollars. Among liquid supports there were selected the solution of molasses 2%, with a production cost of 1.10 dollars. About the pH parameter as well as the percentage of organic matter there were no significant change during the storage.

Keywords: Biofertilizer, *Azospirillum* spp., solid and liquid support, storage, bacterial concentration.

INTRODUCCIÓN

Uno de los retos más importantes para la agricultura es reducir el empleo de fertilizantes nitrogenados y el costo económico, sin que se afecte la productividad del cultivo. Los biofertilizantes representan una alternativa real para alcanzar estos objetivos (Saura G., 2000).

Una de las bacterias promotoras de crecimiento más empleadas a nivel mundial, para la producción de biofertilizantes es *Azospirillum* por su capacidad de producir auxinas, citocininas y giberelinas, el mecanismo analizado con mayor amplitud ha sido la producción de auxinas, especialmente la del ácido indolacético (AIA) que puede modificar el contenido de fitohormonas de las plantas conduciendo a la estimulación del crecimiento de las mismas (Thuler D. *et al.*, 2003).

Actualmente, existen en el mercado mundial, inoculantes de *Azospirillum* en soporte de vermiculita, que se venden en Italia y *Azospirillum lipoferum* microgranulado, registrado en Francia (Saura G., 2000). El principal obstáculo es que el suelo es heterogéneo y tiene un ambiente imprevisible. Los inoculantes bacterianos tienen que competir con la microflora nativa que está más adaptada a las diferentes condiciones del suelo (Bashan Y., 1998). La falta de tecnologías accesibles para los pequeños agricultores maiceros de la sierra ecuatoriana, ha acentuado la pobreza del sector rural, provocando que abandonen el campo poniendo en peligro la seguridad alimentaria de ésta región (Yáñez C. *et al.*, 2003). Dicha problemática impulsó al Programa de Maíz del INIAP-EESC, a desarrollar la caracterización y selección de la bacteria diazotrófica *Azospirillum* spp., asociada con el maíz de altura, de donde se

obtuvieron nueve cepas de *Azospirillum* spp. caracterizadas fenotípicamente (Espinoza L., 2004), cuya eficiencia fue evaluada en campo, utilizando como medio transportador la Turba de Chimborazo, en la cual, se evaluó la sobrevivencia de la bacteria por un mes de almacenamiento en condiciones de laboratorio (Yáñez C. *et al.*, 2003), mientras que de acuerdo al SENASA (Servicio Nacional de Sanidad Agraria, Argentina) el tiempo promedio de almacenamiento es de seis meses para soportes de turba (Perticari A., 2006). En la actualidad, la distribución del biofertilizante a base de cepas nativas de *Azospirillum*, no es posible, puesto que, no se han evaluado soportes a nivel nacional que garanticen al agricultor la efectividad de la bacteria al momento de ser inoculada en campo, además el mercado exige que los inoculantes sean tan baratos como sea posible, el costo de desarrollar un nuevo material inoculante rápidamente mueve el precio fuera del rango de su uso práctico en agricultura, especialmente en países en desarrollo (Díaz A. y Mayek N., 2008) por tal motivo es indispensable la evaluación de soportes sólidos y líquidos para la producción de un biofertilizante a base de *Azospirillum* spp. que se encuentre al alcance del productor de maíz de la sierra ecuatoriana.

MATERIALES Y MÉTODOS

Reactivación y purificación de cepas liofilizadas.

Para la reactivación se colocó 1 ml de peptona al 1%, en el tubo eppendorf que contenía a la cepa C2-Bolívar liofilizada, se agitó hasta homogenizar la mezcla y se inoculó 50 µl en cajas petri con medio Ácido Málico – Rojo Congo sólido, mediante la técnica de dispersión en placa, luego se incubó a 32°C por 7 días, tiempo en el cual se observaron colonias de *Azospirillum* spp. de color rojo escarlata intenso, dichas colonias se aislaron mediante estriado compuesto en cajas Petri con medio Ácido Málico – Rojo Congo sólido, para finalmente incubarlas por 7 días a 32°C y obtener colonias puras de la bacteria.

Reactivación de la cepa a partir de raíces de maíz

Previamente se pregerminaron las semillas de maíz INIAP 101 desinfectadas, dentro de cajas Petri con papel toalla estéril y se incubaron a 25°C durante 3 días y se sembraron en sustrato estéril.

Se preparó inoculante líquido con la cepa C2-Bolívar, con una concentración aproximada de 1×10^7 UFC.ml⁻¹ (Primavesi A., 1982), de ésta suspensión se inocularon 5 ml en cada planta (Alcántar G. *et al.*, 1998) y se las mantuvo bajo invernadero durante 6 semanas, el riego se realizó de forma periódica con agua común estéril.

Transcurrido este tiempo, se extrajeron las plantas y se lavaron las raíces con agua común estéril, se las dejó secar a temperatura ambiente durante 24 horas, se las cortó en trozos muy pequeños y partiendo con 1 g de éstas, se prepararon diluciones seriadas hasta 1×10^{-10} para sembrar 0.3 ml en tubos con 6ml de medio específico semisólido libre de nitrógeno NFB (nitrogen fixation biological) luego de 14 días a 30°C en incubación se consideraron como tubos con crecimiento bacteriano positivo aquellos cuyo medio de cultivo se tornó azul y presentaron una leve película blanquecina a 2-3 mm por debajo de la superficie del medio de cultivo, de ellos se tomó alícuotas para estriarlas en medio ácido málico rojo congo, ya que las colonias de *Azospirillum* en este medio deben tornarse de color rojo oscuro o escarlata. Para ratificar que el nuevo cultivo corresponde a *Azospirillum* spp. se realizaron pruebas Bioquímicas.

Producción de suspensión bacteriana

Con la ayuda de un asa de transferencia se retiraron colonias bacterianas aisladas de un estriado compuesto y se colocaron en una botella con 40 ml de caldo nutritivo.

La cepa se propagó en agitación rotatoria a 120 rpm a 19°C durante 24 horas (Fallick *et al.*, 1988). En un espectrofotómetro a 540 nm. se midió la densidad celular de una muestra y se obtuvo un valor de 1 en absorbancia, según lo descrito por Bashan, 1997, este valor equivale aproximadamente a 1×10^9 UFC.ml⁻¹, esta suspensión bacteriana se diluyó hasta 1×10^7 UFC.ml⁻¹ en solución salina al 0.85% estéril.

Preparación de inoculantes sólidos

Los diferentes materiales se secaron a 40°C por dos días, se molieron y tamizaron, para posteriormente preparar los soportes que se emplearon para los tratamientos sólidos. El empaqueo se realizó en fundas de aluminio polietileno y en cada una de ellas se depositó 30ml del material procesado (se prepararon veinte y cinco fundas de cada tratamiento, de las cuales se utilizaron cinco para cada evaluación de datos). Las fundas selladas fueron esterilizadas en el Departamento de Ciencias Nucleares de la Escuela Politécnica Nacional, mediante aceleración de electrones. La impregnación del inoculante líquido en los soportes sólidos se realizó mediante la inyección de suspensión bacteriana con una concentración de 1×10^7 UFC.ml⁻¹ (Yáñez *et al.*, 2004), el volumen de inóculo líquido que se inyectó, fue de acuerdo al soporte utilizado, (20 ml por cada 50 g de soporte sólido) las fundas fueron nuevamente selladas y los soportes inoculados se incubaron a 30°C por 8 días, período en el cual se realizaron movimientos con el fin de homogenizar el material, transcurrido este tiempo se refrigeró a 4°C por 8 días (Espinoza, 2004), finalmente fueron almacenados a temperatura ambiente.

Para la preparación del tratamiento de zeolita liofilizada se procedió de la misma manera que en los casos anteriores, hasta los 8 días en refrigeración, luego de éste tiempo se abrieron las fundas asépticamente, se cubrieron con papel filtro estéril y se colocaron en el liofilizador durante 24 horas. Transcurrido éste periodo se sellaron las fundas y fueron almacenadas a temperatura ambiente.

Para la Inmovilización de células se preparó Alginato de Sodio al 2%, y se mezcló con la suspensión de células bacterianas. Con la ayuda de una jeringa se tomaron alícuotas de la mezcla alginato/células y se dejaron caer en cloruro de calcio a 0.2 Molar, las esferas obtenidas se mantuvieron en reposo por 30 minutos (Pérez A. *et al.*, 2002) y se empacó la cantidad correspondiente a 30 ml en cada funda de aluminio polietileno estéril.

Preparación de inoculantes líquidos

Se eligieron como soportes líquidos a las siguientes soluciones: Carboximetilcelulosa, medio de cultivo Acido málico-rojo congo, caldo nutritivo, NFB, melaza y solución aproximada a biofertilizante comercial. Para conocer la concentración a la cual se debían preparar éstas soluciones se realizaron curvas de crecimiento: Concentración de la solución vs. UFC.ml⁻¹ y así se determinó:

- Solución de Carboximetilcelulosa al 5%
- Solución del medio ácido málico-rojo congo al 35%
- Solución de Caldo nutritivo al 70%
- Solución del medio NFB al 70%
- Solución de melaza al 2%

Una vez preparados los soportes líquidos, se empacaron 27 ml de cada uno, en fundas de aluminio polietileno y se esterizaron a 121°C a 15 psi durante 15 minutos (se prepararon veinte y cinco fundas de cada tratamiento, de las cuales se utilizarán cinco para cada evaluación de datos).

Se preparó la suspensión bacteriana con una concentración de 1×10^9 UFC.ml⁻¹. Posteriormente en un tubo de ensayo estéril se colocó 1 ml de la propagación bacteriana y 9 ml del soporte líquido, obteniéndose una concentración de 1×10^8 UFC.ml⁻¹, de ésta dilución se transfirieron 3 ml a cada funda de aluminio polietileno estéril con 27 ml de la solución líquida correspondiente (de tal manera que se obtiene una concentración inicial de 1×10^7 UFC.ml⁻¹), se sellaron e incubaron a 30°C por 8 días, una vez transcurrido este tiempo se refrigeraron a 4°C por 8 días y finalmente se almacenaron a temperatura ambiente.

La preparación de la solución en base al biofertilizante comercial partió del análisis de minerales totales, nitrógeno total y pH del producto comercial NoctinAzo y de acuerdo a los resultados obtenidos se preparó una solución semejante a esta.

MÉTODOS DE EVALUACIÓN

Sobrevivencia

Para la evaluación de la sobrevivencia de *Azospirillum* spp. se realizaron diluciones a partir de cada soporte inoculado, desde 1×10^{-2} hasta 1×10^{-7} . De cada dilución se sembró 0.1 ml en una caja Petri con medio Ácido Málico - Rojo Congo y transcurridos 7

días de incubación a 30°C se determinó la presencia de la bacteria *Azospirillum* spp. mediante conteo en placa (Rodríguez y Cáceres, 1982).

En el caso del tratamiento de perlas de alginato, se cuantificaron las células encapsuladas disolviendo 1 g de esferas en citrato de sodio a 0.1 Molar, a partir del cual se realizaron diluciones, desde 1×10^{-2} hasta 1×10^{-7} en tubos con 9 ml de solución salina al 0.85% (Pérez *et al.*, 2002) y se procedió de igual manera que en los casos anteriores hasta el conteo en placa.

Para realizar las curvas de crecimiento, se transformaron las concentraciones bacterianas obtenidas a logaritmos naturales y se graficó: $\ln \text{UFC.g}^{-1}$ o $\ln \text{UFC.ml}^{-1}$ vs. Tiempo de almacenamiento. Además se calcularon datos de cinética bacteriana, de acuerdo a Pisabarro, 2009, utilizando las siguientes ecuaciones:

Tasa de crecimiento:
$$\mu = \frac{\ln N - \ln N_0}{t}$$

Tasa de muerte:
$$k = \frac{\ln N - \ln N_0}{t}$$

Número de generación:
$$g = \frac{\mu * t}{\ln(2)}$$

Tiempo de generación:
$$T = \frac{t}{g}$$

Donde:

- μ : Tasa de crecimiento
- N: Número final de unidades formadoras de colonias
- N_0 : Número inicial de unidades formadoras de colonias
- t: tiempo
- k: Tasa de muerte
- g: Número de generaciones
- T: Tiempo de generación

pH

El pH se determinó pesando 10 ml de cada soporte sólido inoculado al cual se le agregó 25 ml de agua destilada. Se empleó un pH-metro previamente calibrado. En el caso de los inoculantes líquidos se midió

directamente en la solución (ISO 10390, 2005).

Porcentaje de materia orgánica en soportes sólidos

Para la determinación de materia orgánica, se empleó un crisol previamente esterilizado y pesado, donde se depositaron 3 g. de soporte (Peso 1), luego se introdujo en la mufla a 600°C durante 6 horas y se reportó un peso final (Peso 2) (Steugbing L. *et al.*, 2001):

$$\% \text{ Materia Orgánica} = \frac{\text{Peso 1} - \text{Peso 2}}{\text{Peso 1}} * 100$$

Porcentaje de contaminación

Esta variable se evaluó contabilizando el número total de colonias que se presentaron en las cajas empleadas para la prueba de sobrevivencia, el cual representó el 100% de la población, posteriormente se contó el número de colonias que no pertenecieron al género *Azospirillum*, que correspondió al porcentaje de contaminación.

Análisis Post-Evaluación

Pruebas Bioquímicas

Se realizaron las siguientes pruebas Bioquímicas: Tinción de Gram y Forma celular, Presencia de la enzima catalasa, Motilidad, Fijación de nitrógeno y Presencia de Poli- β -hidroxibutirato con la finalidad de confirmar que la población bacteriana obtenida al finalizar el tiempo de almacenamiento, corresponde a la cepa inicialmente inoculada:

Análisis de costos de producción

Se evaluó el costo de producción de los tratamientos que presentaron una población igual o superior a 1×10^7 UFC.ml⁻¹. Aplicando la siguiente fórmula:

$$CP = MPD + MOD + CIF$$

Donde:

- CP: Costo de producción
- MPD: Materia prima directa
- MOD: Mano de obra directa
- CIF: Costos indirectos de fabricación (Naranjo J. y Naranjo M., 2003).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Evaluaciones de soportes sólidos y líquidos durante seis meses de almacenamiento

Sobrevivencia de *Azospirillum* spp.

Las diferentes concentraciones obtenidas en las pruebas de sobrevivencia en tratamientos sólidos y líquidos fueron transformadas a Ln UFC.g⁻¹ (Tabla N.1) o Ln UFC.ml⁻¹ (Tabla N.2), según corresponda y se realizaron curvas de crecimiento, Figura N.1 y Figura N.2

Evaluaciones de soportes sólidos y líquidos durante seis meses de almacenamiento.

Tabla N.1. Ln de la Concentración de *Azospirillum* spp. (Ln UFC.g⁻¹) en soportes sólidos durante 180 días de almacenamiento

Sopores sólidos	0 días	45 días	90 días	135 días	180 días
*t1	23.4 55	24.2 53	20.1 43	16.11 8	13.77 5
*t2	20.7 23	20.2 77	20.2 77	19.70 7	17.28 1
*t3	19.9 02	22.9 93	21.2 77	20.45 4	20.12 9
*t4	21.6 07	24.3 10	16.8 11	16.45 5	16.11 8
*t5	20.7 03	19.8 56	16.9 07	16.23 1	16.17 6
*t6	19.5 19	21.5 12	18.5 34	18.31 5	17.91 0

*t1: Turba de Chimborazo; *t2: Mezcla; *t3: Turba con vermiculita; *t4: Humus de lombriz; *t5: Zeolita liofilizada; *t6: Perlas de alginato

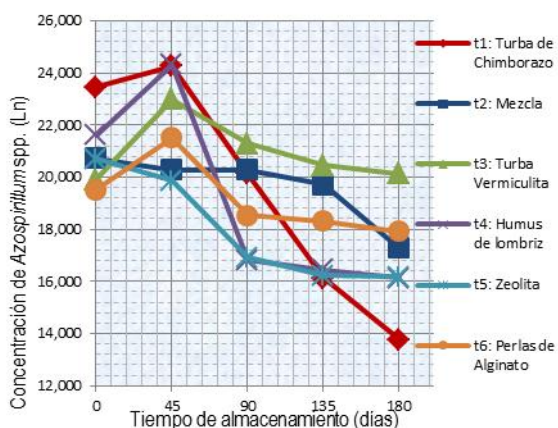


Figura N. 1. Gráfico de las curvas de crecimiento de cepa C2-Bolívar de *Azospirillum* spp. en soportes sólidos

durante seis meses de almacenamiento.

Tabla N.2. Ln de la Concentración de *Azospirillum* spp. en soportes líquidos durante 180 días de almacenamiento

Sopores Líquidos	0 días	45 días	90 días	135 días	180 días
*t7	24.2 96	19.4 50	18.4 40	18.42 1	18.00 5
*t8	24.5 36	19.7 02	18.0 05	17.97 4	16.99 4
*t9	22.1 00	17.6 87	17.6 44	17.60 0	17.21 7
*t10	19.2 09	21.1 68	19.3 76	19.36 1	18.89 1
*t11	19.5 19	21.5 99	19.9 89	19.76 6	19.77 1
*t12	22.0 04	21.9 87	18.0 35	18.03 5	17.64 4

*t7: Solución de Carboximetilcelulosa 5%; *t8: Solución de Medio Ácido málico rojo congo 35%; *t9: Solución de Caldo Nutritivo 70%; *t10: Solución de Medio NFB 70%; *t11: Solución de melaza 2%; *t12: Solución aproximada a biofertilizante comercial

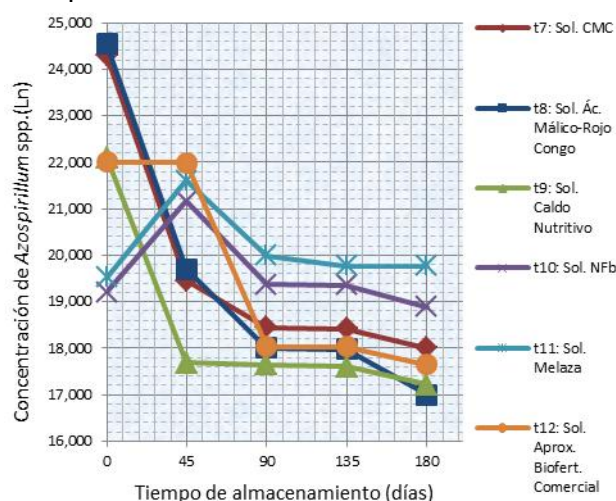


Figura N.2. Gráfico de las curvas de crecimiento de cepa C2-Bolívar de *Azospirillum* spp. en soportes líquidos durante seis meses de almacenamiento

Como se puede apreciar en la Figura N.1 y Figura N.2, en ninguno de los soportes la bacteria presenta fase de latencia, esto se debe a que la suspensión bacteriana se

inoculó en fase de crecimiento exponencial, donde el microorganismo estuvo adaptado al medio inicial (Caldo Nutritivo) y al inocularlo en los diferentes soportes se enfrenta a un variante de nutrientes y condiciones medioambientales, que al ser favorables se traducen a un crecimiento exponencial al inicio del almacenamiento, por otra parte, en los soportes que cuentan con concentraciones de nutrientes y condiciones medioambientales contraproducentes, con este comportamiento no significa que la bacteria haya perdido su viabilidad para actuar en campo, ya que, según lo señalado por Willey J. *et al.*, 2008, el hecho que el microorganismo se halle en fase de muerte, no quiere decir que las células hayan perdido irreversiblemente su capacidad para reproducirse, únicamente, en esta fase los microorganismos son temporalmente incapaces de crecer, en este caso, bajo las condiciones que le brinda el soporte dentro de la bolsa sellada, a temperatura ambiente, y una vez que la bacteria es expuesta a condiciones apropiadas, al momento de la inoculación, el microorganismo reanuda su crecimiento.

Tabla N.3. Resultados de la cinética del desarrollo bacteriano en soportes sólidos

Sopores sólidos	Tasa de crecimiento ($\mu = \text{día}^{-1}$)	# de generaciones (g)	Tiempo de generación (T=día)	Tasa de muerte ($k = \text{día}^{-1}$)
*t1	0.0177	1.1514	39.0815	-0.0834
*t2	0	0	0	0.0307
*t3	0.0687	4.4594	10.0910	0.0251
*t4	0.0601	3.8997	11.5393	0.0859
*t5	0	0	0	0.0308
*t6	0.0443	2.8745	15.6551	-0.0366

respecto al caldo nutritivo inicial, la población bacteriana decrece desde el inicio del almacenamiento, dando lugar a una fase de declive o muerte.

De acuerdo a las curvas de crecimiento realizadas, la bacteria se encuentra mayor tiempo en fase de declive que en una fase de crecimiento exponencial, sin identificarse las fases de latencia y estacionaria

66

*t1: Turba de Chimborazo; *t2: Mezcla; *t3: Turba con vermiculita; *t4: Humus de lombriz; *t5: Zeolita liofilizada; *t6: Perlas de alginato

En cuanto a la cinética del desarrollo bacteriano en soportes sólidos, de acuerdo a la Tabla N.3. en el tratamiento t3, la bacteria crece con mayor rapidez, con un tiempo por generación de 10.09 días, ocurriendo 4.46 generaciones durante los primeros 45 días de almacenamiento, que constituyen la fase de crecimiento exponencial, mientras que en los siguientes 135 días de almacenamiento, la tasa de muerte es de 0.0251 día^{-1} , siendo la menor entre los seis tratamientos sólidos, constituyendo la mejor alternativa, para mantener la sobrevivencia de la bacteria durante el almacenamiento. En el caso de los tratamientos t2 y t5, no existe una fase exponencial, por lo tanto la tasa de crecimiento, número y tiempo de generación es cero, únicamente presenta fase de declive, con una tasa de muerte de 0.0307 en el tratamiento t2 y 0.0308 en el tratamiento t5. Con respecto al tratamiento t1, es el que presenta menor rapidez de crecimiento bacteriano en la fase exponencial, requiriendo 39.08 días para producir una nueva generación, es así que a los 45 días de almacenamiento, se generan 1.15 generaciones, presentando a continuación una tasa de muerte de 0.0834 día^{-1} que es la más alta junto a la del humus de lombriz. En el tratamiento t6, ocurren 2.87 generaciones bacterianas en los 45 días de la fase exponencial, con un tiempo por generación de 15.66 días. Pasando a la fase de declive con una tasa de muerte de 0.0366 día^{-1} .

Tabla N.4. Resultados de la cinética del desarrollo bacteriano en soportes líquidos

Sopores líquidos	Tasa de crecimiento ($\mu=\text{día}^{-1}$)	Número de generaciones (g)	Tiempo de generación (T=día)	Tasa de muerte (k=día ⁻¹)
*t7	0	0	0	- 0,0592
*t8	0	0	0	- 0,0659
*t9	0	0	0	- 0,0508
*t10	0,0435	2,8260	15,9237	- 0,0187
*t11	0,0462	3	15	- 0,0191
*t12	0	0	0	- 0,0308

*t7: Solución de Carboximetilcelulosa 5%;
 *t8: Solución de Medio Ácido málico rojo congo 35%; *t9: Solución de Caldo Nutritivo 70%; *t10: Solución de Medio NFB 70%;
 *t11: Solución de melaza 2%; *t12: Solución aproximada a biofertilizante comercial

De acuerdo a los resultados obtenidos en la cinética de la cepa C2-Bolívar en soportes líquidos, Tabla N.4, los tratamientos t7, t8, t9 y t12, no presentan fase exponencial, por lo tanto, es nula, la tasa de crecimiento, número y tiempo de generación, presentando únicamente fase de declive, durante los 180 días de almacenamiento, donde el tratamiento t8, muestra la mayor tasa de muerte, 0.0659 días⁻¹, seguida del tratamiento t7, 0.0592 días⁻¹, posteriormente el tratamiento t9, con una tasa de muerte de 0.0508 días⁻¹, y finalmente el tratamiento t12 con 0.0308 días⁻¹. Mientras que en el tratamiento t10, ocurren 2.826 generaciones en los 45 días de la fase exponencial, empleando 15.92 días para dar lugar a cada nueva generación, atravesando la fase de declive los siguientes 135 días de almacenamiento, con una tasa de muerte de 0.0187 días⁻¹, siendo la menor entre los seis

soportes líquidos evaluados. En el tratamiento t11, se desarrolla con mayor rapidez, con un tiempo por generación de 15 días, dando lugar a 3 generaciones en los primeros 45 días de almacenamiento que equivale a la fase de crecimiento exponencial, continuando con la fase de declive, con una tasa de muerte de 0.0191 días⁻¹ que es prácticamente igual a la del tratamiento t10. Consecuentemente los tratamientos más recomendables para la producción de un biofertilizante líquido, son la Solución de NFB al 70% y la de Melaza al 2%.

pH

Los promedios de los pHs obtenidos durante los 180 días de almacenamiento en los soportes sólidos y líquidos se indican en la Tabla N.5, donde se aprecia en general que el metabolismo bacteriano tiende a acidificar el medio. La mayor parte de las bacterias muestra una tasa de crecimiento óptimo en el rango de pH entre 6.5 y 7.5. Sin embargo, las bacterias son capaces de desarrollarse en forma correcta con un pH entre 4.0 y 10.0 (Rodríguez D. *et al.*, 2004).

Tabla N.5. Promedio de pHs de cada tratamiento sólido y líquido durante 180 días de almacenamiento

Tratamientos	Tiempo de almacenamiento				
	0 días	45 días	90 días	135 días	180 días
*t1	4,35	4,30	4,27	4,20	4,35
*t2	6,22	6,18	5,96	6,09	6,17
*t3	6,46	6,57	6,60	6,45	6,63
*t4	7,25	7,53	7,73	7,53	7,49
*t5	7,88	7,66	7,61	7,56	7,55
*t6	6,89	6,68	6,56	6,54	6,60
*t7	6,41	6,51	6,44	6,26	6,23

*t8	8,2	8,1	7,6	7,64	7,35
	8	1	9		
*t9	7,7	7,6	7,4	7,42	7,41
	4	8	9		
*t10	8,1	8,1	8,0	7,69	7,67
	9	7	3		
*t11	4,1	4,0	4,1	4,05	3,98
	6	6	7		
*t12	7,0	7,0	6,9	6,93	6,75
	2	0	3		

*t1: Turba de Chimborazo; *t2: Mezcla; *t3: Turba con vermiculita; *t4: Humus de lombriz; *t5: Zeolita liofilizada; *t6: Perlas de alginato; *t7: Solución de Carboximetilcelulosa 5%; *t8: Solución de Medio Ácido málico rojo congo 35%; *t9: Solución de Caldo Nutritivo 70%; *t10: Solución de Medio NFB 70%; *t11: Solución de melaza 2%; t12: Solución aproximada a biofertilizante comercial

De acuerdo al análisis de varianza, no se identificó una diferencia altamente significativa en los tratamientos t1, t2, t3, t4, t6, t7, t9, t10 y t11, mientras que en los tratamientos t5, t8 y t12, se puede apreciar una leve acidificación en cada soporte.

La conservación del rango de pH en los tratamientos: t1, t2, t3, t4 y t6, se debe a que cuentan con un alto porcentaje de materia orgánica, proporcionándole al soporte una mayor capacidad tampón, estabilizando de ésta manera el pH, ante los productos del metabolismo microbiano (Binato A., 2001 Citado por Estrada G., 2008).

Porcentaje de materia orgánica en soportes sólidos

En la Tabla N.6. se aprecian los promedios de los porcentajes de materia orgánica en cada tratamiento durante 180 días de almacenamiento, donde se observa que el tratamiento t3: Turba con vermiculita, presenta el más alto porcentaje de materia orgánica, seguido del t4: Humus de lombriz, luego el tratamiento t1: Turba de Chimborazo y con menor porcentaje de materia orgánica el t2: Mezcla, estos resultados tienen una relación directamente proporcional con las tasas de crecimiento, es decir, a mayor porcentaje de materia orgánica, el microorganismo presenta una mayor tasa de crecimiento.

Al relacionar el pH con el porcentaje de materia orgánica, se afirma que los niveles altos de materia orgánica contribuyen al mantenimiento constante del pH, lo que se aprecia en los tratamientos t1-t4, que al ser materiales provenientes de la descomposición de desechos orgánicos, su nivel de materia orgánica es elevado, mientras que en el t5, al ser un material netamente mineral, su porcentaje de materia orgánica, es nulo, y prácticamente, los resultados obtenidos en este soporte, corresponden a la masa bacteriana existente.

Tabla N.6. Promedio de porcentaje de materia orgánica de cada tratamiento sólido durante 180 días de almacenamiento

Tratami entos	Tiempo de almacenamiento				
	0 día	45 días	90 días	135 días	180 días
*t1	49,33	48,95	48,84	47,38	47,69
*t2	48,46	47,76	47,76	47,69	47,67
*t3	84,81	84,48	84,49	84,50	84,44
*t4	54,57	54,01	53,80	53,59	53,58
*t5	9,54	9,36	9,30	9,41	9,39

*t1: Turba de Chimborazo; *t2: Mezcla; *t3: Turba con vermiculita; *t4: Humus de lombriz; *t5: Zeolita liofilizada

Al realizar el análisis de varianza, para el porcentaje de materia orgánica, en cada uno de los tratamientos sólidos inoculados (t1-t5), durante los 180 días de almacenamiento, no se evidencia una diferencia altamente significativa, lo que quiere decir que el porcentaje de materia orgánica se mantiene prácticamente constante durante el almacenamiento.

Porcentaje de contaminación

En el transcurso de los seis meses de almacenamiento, no se apreció contaminación, únicamente irregularidad en el borde, elevación y consistencia de ciertas colonias, las cuales se confirmaron como *Azospirillum* spp. mediante pruebas Bioquímicas realizadas al finalizar la investigación.

Análisis Post-Evaluación Pruebas Bioquímicas

A los posibles *Azospirillum* o contaminaciones se las identificó como PA1, PA2, PA3, PA4 y PA5, se las aisló en medio ácido málico-rojo congo, luego en medio agar nutriente, para finalmente realizar pruebas bioquímicas, con la finalidad de descartar una posible contaminación. Los resultados se indican en la Tabla N.7.

Tabla N.7. Pruebas Bioquímicas realizadas a Posibles *Azospirillum* spp

Pruebas Bioquímicas	Posibles <i>Azospirillum</i> spp. (PA)				
	PA1	PA2	PA3	PA4	PA5
Tinción de gram	-	-	-	-	-
Forma celular	Bacilar	Bacilar	Bacilar	Bacilar	Bacilar
Motilidad	+	+	+	+	+
Fijación de Nitrógeno	+	+	+	+	+

Presencia de Poli-β-hidroxibutirato	+	+	+	+	+
--------------------------------------------	---	---	---	---	---

Fuente: Yolanda Pallo. Laboratorio de microbiología de la Facultad de Ciencia e Ingeniería en alimentos de la Universidad Técnica de Ambato.

De acuerdo a las pruebas bioquímicas realizadas, se descarta totalmente que se trate de contaminación, estas variaciones se atribuyen al estrés que se enfrentan las células al ser sometidas a condiciones limitadas de nutrientes. Es así que la presencia de Poli-β-hidroxibutirato, es muy notable, este polímero es generado por la célula como medio de protección ante la falta de humedad del medio, sirviendo como almacén de Carbono y energía (Okon Y. e Iltisohn R., 1992).

Análisis de costos de producción de los mejores tratamientos

Se han considerado como mejores tratamientos aquellos que han alcanzado una concentración igual o superior a 1×10^7 UFC.ml⁻¹ a los seis meses (180 días) de almacenamiento, puesto que, a esta concentración es factible su inoculación en campo, de acuerdo a Okon y Gonzales, 1994.

Tabla N. 8. Resumen de costos de producción de tratamientos sólidos que han alcanzado una población bacteriana igual o mayor a 1×10^7 UFC.g⁻¹ a los 180 días de almacenamiento.

Tratamientos	Materia prima directa	Mano de obra directa	Costos indirectos de fabricación						Costo total de 25 fundas de	Costo / 30ml biofertilizant
			Reactivos	Insumos	Material/laboratorio	Equipos	Servicios básicos	Esterilización		
*t2	0.23	22.00	2.98	10.44	0.09	3.65	1.44	0.31	41.13	1.65
*t3	2.00	31.90	2.98	10.44	0.09	3.69	1.44	0.135	52.67	2.11
*t4	0.55	22.00	2.98	10.44	0.09	3.66	1.44	0.31	41.49	1.66
*t5	1.20	17.60	2.98	13.57	0.09	4.22	1.71	0.31	41.68	1.67
*t6	3.24	18.70	2.98	10.44	0.11	3.74	1.51		40.71	1.63

*t2: Mezcla; *t3: Turba con vermiculita; *t4: Humus de lombriz; *t5: Zeolita liofilizada; *t6: Perlas de alginato

Tabla N. 9. Resumen de costos de producción de tratamientos líquidos que han alcanzado una población bacteriana igual o mayor a 1×10^7 UFC.ml⁻¹ a los 180 días de almacenamiento.

Tratamientos	Materia prima directa	Mano de obra directa	Costos indirectos de fabricación					Costo total de 25 fundas de	Costo / 30ml biofertilizante
			Reactivos	Insumos	Material/laboratorio	Equipos	Servicios básicos		
*t7	12.00	8.80	2.98	10.44	0.11	3.60	1.44	39.37	1.57
*t8	0.81	8.80	2.98	10.44	0.11	3.60	1.44	28.17	1.13
*t9	1.26	8.80	2.98	10.44	0.11	3.60	1.44	28.63	1.15
*t10	2.25	8.80	2.98	10.44	0.11	3.60	1.44	29.62	1.18
*t11	0.03	8.80	2.98	10.44	0.11	3.60	1.44	27.40	1.10
*t12	0.96	8.80	2.98	10.44	0.11	3.60	1.44	28.33	1.13

*t7: Solución de Carboximetilcelulosa 5%; *t8: Solución de Medio Ácido málico rojo congo 35%; *t9: Solución de Caldo Nutritivo 70%; *t10: Solución de Medio NFB 70%; *t11: Solución de melaza 2%; *t12: Solución aproximada a biofertilizante comercial

De acuerdo al análisis de costos de producción, cuyos resultados se indican en la Tabla N.8 y N.9, el tratamiento sólido que presenta menor costo de producción es el t6, con un valor de 1.63 dólares, seguido por el tratamiento t2, con un costo de 1.65 dólares, mientras que el más costoso, es el t3, con un costo que asciende a los 2.11 dólares. Entre los tratamientos líquidos el biofertilizante a base de *Azospirillum* spp. soportado en solución de melaza al 2%, es el tratamiento más conveniente, con un costo de 1.10 dólares.

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

De los doce soportes evaluados, únicamente en t1: Turba de Chimborazo no se obtiene una concentración igual o superior a 1×10^7 UFC.g⁻¹ o UFC.ml⁻¹, a los seis meses de almacenamiento (concentración adecuada para la aplicación en campo), por otra parte al tomar en cuenta los costos de producción, se descarta la Turba con vermiculita, a pesar de ser en la que se alcanza una mayor concentración bacteriana, puesto que, el costo de producción de 30 ml de biofertilizante es de 2.11 dólares, y se elige como mejor soporte sólido a las

perlas de alginato con un costo de producción de 1.63 dólares y alternativamente a la mezcla (Turba de Chimborazo + 1% CaCO₃ + 3% raíz maíz) con un costo de producción de 1,65 dólares. Como soporte líquido se selecciona a la solución de melaza al 2%, con un costo de producción de 1.10 dólares la funda de 30 ml de producto.

REFERENCIAS

ALCÁNTAR, G., ALMARAZ, J., DÍAZ, P. y FERRERA, R. 1998. Inoculación de bacterias promotoras de crecimiento en lechuga. *Terra*. 19: 333-335.

BASHAN, Y. 1997. Aplicaciones Biotecnológicas en Ecología Microbiana. Cundinamarca, CO. Pontificia Universidad Javeriana – Centro de Investigaciones Biológicas del Noreste. Pp. 1 - 3

BASHAN, Y. 1998. Inoculants of growth-Promoting Bacteria for use in Agriculture. Department of Microbiology, Division of Experimental Biology. The Center for Biological Research of the Northwest. México. Pp. 1 – 3

DÍAZ A. y MAYEK N., 2008. La biofertilización como tecnología sostenible. Editorial Plaza Valdés. Tamaulipas-México, P. 180

ESPINOZA, L. 2004. Caracterización y selección de la bacteria diazotrófica *Azospirillum* spp., asociado con el maíz de altura (*Zea mays* L). INIAP. Tesis Ingeniero. Agrónomo. Pp. 47- 90.

ESTRADA, G., 2008, . Calidad de inoculantes almacenados a diferentes temperaturas: efecto sobre la población, humedad y pH del producto. Tesis Microbiólogo Industrial. Pontificia Universidad Javeriana, Facultad de Ciencias, Carrera de Microbiología industrial. P. 44

FALLICK, E., OKON, Y. y FISCHER, M. 1988. Growth response of maize roots to *Azospirillum* inoculation. Effect of soil organic matter content, number of

rhizosphere bacteria and tuning of inoculation. *Soil BiolBiochem*. Pp.25-49.

ISO 10390. 2005. Soil quality-Determination of pH

NARANJO, M. y NARANJO, J. 2003. Contabilidad de Costos. 2da. Edición. Quito – Ecuador. Pp. 13 – 14

OKON, Y. y GONZALES, L. 1994. Agronomic applications of *Azospirillum*: An evaluation of 20 years worldwide field inoculation. *Soil Biol. Biochem*. 26: 1592

PÉREZ, A.; VELÁZQUEZ J. y HERNÁNDEZ H. 2002. Inmovilización de *Lactococcuslactis* en Capsulas de Alginato; Universidad Juárez Autónoma de Tabasco – División Académica de Ciencias Agropecuarias; Tabasco - México D.F. pp. 316 – 317.

PISABARRO, A., 2009. Microbiología general. Pp. 20-23 Consultado el 18 de Diciembre del 2010. Disponible en: http://www.unavarra.es/genmic/microgral/02_cultivo%20microorganismos%20MG%2008-09.pdf

PERTICARI, A. 2006. Especial inoculación; Convenio de Asistencia Técnica INTA-25. Buenos Aires – Argentina; Consultado el 12 de febrero del 2010. Disponible en <http://www.lanacion.com.ar/nota>.

PRIMAVESI, A. 1982. Manejo ecológico del suelo. *snt*. P. 499

RODRÍGUEZ, D. MUÑOZ, R. CORNEJO, J. y ESPINOZA, C. 2004. Microbiología ambiental. P. 4. Consultado el 3 de Marzo del 2010. Disponible en https://www.ucursos.cl/ingenieria/2009/1/CI41B/1/material_docente/bajar?id_material=223016.

RODRÍGUEZ, E. y CÁCERES A. 1982. Improved médium for isolation of *Azospirillum* spp., *Applieta Microbiology and Environmental*. 44(2): 940-991.

SAURA, G.; 2000. Uso de *Azospirillum* sp. en caña de azúcar; FIAGRO; Buenos Aires – Argentina.

STEUGBING, L., GODOY, R. y ALBERDI M. 2001. Métodos de Ecología Vegetal. Editorial Universitaria. Santiago de Chile. P. 121.

THULER, D., NADRO, W., BARBOSA, H. 2003. Plant growth regulator and amino acids released *Azospirillum* spp. in chemicals defined media Microbiology. P. 174

WILLEY, J., SHERWOOD, L., WOOLVERTON C., 2008. Microbiología de Prescott, Harley y Klein. Séptima Edición. GrawHill. Nueva York-EEUU. PP. 123-126.

YÁÑEZ, C.; ZAMBRANO, J.; CAICEDO, M.; SÁNCHEZ, H.; HEREDIA, J. 2003. Catálogo de Recursos Genéticos de Maíces de Altura Ecuatorianos (Programa de Maíz. EESC-INIAP, Quito, Ecuador.) P. 2

YÁÑEZ, C., ZAMBRANO, J., CAICEDO, M., SÁNCHEZ, H. y HEREDIA, J. 2004. Informe Técnico Final del Proyecto IQ-CV_102, Programa de Maíz. Estación Experimental Santa Catalina; INIAP, Quito-Ecuador. Pp. 41-49