

Escalado de la producción del biofertilizante Fertilaz y su validación agrícola

Isbel González-Marrero^{1*}, María Cristina Pérez-Peñaranda¹, Julio Oramas-García¹, Yoel Beovides-García², Jaime Simó-González², Yoandra Román-Tabio¹ y Emilio Arcadio Sotolongo-Valdés³

1. Grupo Empresarial Laboratorios Biológicos Farmacéuticos (LABIOFAM). Ave. Independencia, km 16½, Boyeros. La Habana, Cuba.
2. Instituto de Investigaciones de Viandas Tropicales (INIVIT). Santo Domingo. Villa Clara, Cuba.
3. Universidad Tecnológica de La Habana. Calle 114 No. 11901 e/Ciclovía y Rotonda, Marianao, La Habana, Cuba.

* isbelgonzalezmarrero@gmail.com

RESUMEN

Este trabajo propuso desarrollar la producción del biofertilizante Fertilaz. Se seleccionaron criterios para el escalado teniendo en cuenta la no similitud geométrica de los fermentadores de 42 y 500 L. La efectividad técnica del bioproducto resultante se evaluó en plantas *in vitro* de plátano cv. INIVIT PV 06-30 en fase de aclimatación y en dos cultivares de boniato (INIVIT B-50 y CEMSA-78-354), Fertilaz se aplicó por aspersión, a razón de 20 L ha⁻¹. Se ejecutaron cinco riegos durante el ciclo del boniato, se aplicó por aspersión y con una norma parcial de 250 m³ ha⁻¹. El riego se suspendió 15 días antes de la cosecha. Los resultados mostraron que, bajo las condiciones establecidas, se obtuvo crecimiento bacteriano con cinética similar en las dos escalas. Las fermentaciones concluyeron a las 12 horas de iniciado el cultivo. A los 60 días, después de la plantación, se observó una respuesta positiva del desarrollo, ya que siempre se realizaron, al menos, tres aplicaciones sobre el sustrato, cada siete días. Se disminuye en 25 kg ha⁻¹ la dosis de fórmula completa (0.75 t ha⁻¹) recomendada para el cultivo del boniato. La producción del biofertilizante *puede* llevarse a cabo en un fermentador de tipo tanque agitado de 500 L (volumen efectivo de 350 L), durante 12 h, a 178 rpm y flujo 110 L min⁻¹, que garantiza una concentración de 1x10⁹ UFC ml⁻¹.

Palabras clave: *azotobacter chroococcum*, escalado, plátano, boniato.

ABSTRACT

This work proposed to develop the production of the Fertilaz bio fertilizer. The criteria for scaling were selected taking into account the geometric non-similarity of the 42 and 500 liter fermenters. The technical effectiveness of the resulting bio product was evaluated on *in vitro* cv. INIVIT PV 06-30 banana plants in the acclimatization phase and in two sweet potato cultivars (INIVIT B-50 and CEMSA-78-354). Fertilaz was applied by spraying at a rate of 20 L ha⁻¹. Five irrigations were carried out during the sweet potato cycle, they were applied by spraying, and with a partial standard of 250 m³ ha⁻¹. The irrigation was suspended 15 days before harvest. The results showed that under the established conditions bacterial growth was obtained with similar kinetics in the two scales. The fermentations concluded 12 hours after the start of the culture. At 60 days after planting, a positive development response was observed as long as at least, the three applications were made on the substrate every seven days. The dose of the complete formula (0.75 t ha⁻¹) recommended by the Technical Instructions for Sweet Potato Cultivation (INIVIT, 2012) was decreased by 25 kg ha⁻¹. The biofertilizer production can be carried out in a 500 L stirred tank fermenter (350 L effective volume) for 12 h at 178 rpm and 110 L min⁻¹ flow, which guarantees a concentration of 1x10⁹ CFU ml⁻¹.

Key words: *Azotobacter chroococcum*, scaled, banana, sweet potato.

INTRODUCCIÓN

La agricultura tradicional intenta desarrollar la producción agrícola mediante el manejo del agua, los nutrientes, el control de malezas, insectos y organismos fitopatógenos. Actualmente se trabaja en la agricultura de precisión, que se enfoca en identificar los puntos más sensibles del manejo del cultivo para aumentar su rendimiento y disminuir la cantidad de agroquímicos utilizados (1).

El uso excesivo de fertilizantes químicos y plaguicidas no solo deteriora la calidad del suelo sino también degrada, en gran medida, la calidad del agua subterránea y, por lo tanto, los nutrientes minerales disponibles. El uso reiterado e indiscriminado de estas prácticas ha provocado que el 60 % de los suelos cubanos presente contenidos, en un rango de bajo a muy bajo, de materia orgánica (2).

La creciente demanda de producción de cultivos con una reducción significativa del uso de fertilizantes químicos sintéticos y plaguicidas es un gran desafío. La producción comercial de biofertilizantes y su fácil disponibilidad en el mercado podría contribuir a cambiar esta situación en diferentes sectores agrícolas. Por esta razón, el uso de estos bioproductos ha tomado, cada vez más fuerza, debido a que se puede recuperar la fertilidad de las tierras, al aportar microorganismos benéficos que ayudan a lograr el equilibrio ecológico. Las rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal (PGPR, por sus siglas en inglés: *Plant Growth Promoting Rhizobacteria*) muestran un papel importante en la industria de la agricultura sostenible y se han obtenido resultados alentadores (3-7).

El empleo de biofertilizantes adquiere cada vez mayor importancia en el mundo, no sólo por los rendimientos que suelen alcanzarse sino también por lo económico de su aplicación y por contribuir con la preservación del medioambiente (8).

Los inoculantes microbianos adquirirán una mayor importancia en el contexto de la agricultura cubana de los próximos años, pues son imprescindibles para garantizar rendimientos agrícolas estables y asegurar un balance de nutrientes más positivo. Esto permitirá proteger la fertilidad de los suelos y el medioambiente.

La presión competitiva en la industria biotecnológica hace necesario contar con procedimientos de escalados rápidos y directos, para poder acortar el tiempo que transcurre entre la concepción de un nuevo producto y la puesta en marcha de la planta correspondiente a escala industrial (9).

Cuando se realiza un proceso de escalado se busca reproducir los resultados de interés, sin necesidad de reproducir todas las condiciones de operación. Por ejemplo, la temperatura influye apreciablemente en la cinética de crecimiento, por ello se desea mantenerla constante en cada escala; la composición del medio de fermentación es la misma que se determinó en la escala de laboratorio, como la mejor para obtener el producto de interés. Otros parámetros como el flujo de aire y la velocidad de agitación varían al pasar de una escala a la otra (10).

Gran parte de los procesos biotecnológicos son aerobios y se llevan a cabo en biorreactores tipo tanque agitado, razón por la que se han desarrollado diversas investigaciones para comprender la teoría de escalado en este tipo de proceso. En el caso de la fermentación aeróbica, el predecir resultados a escala de producción, basados en el escalamiento de datos obtenidos en el laboratorio o en la planta piloto, requiere de un análisis cuidadoso de cada una de las escalas, tanto en sus variables físico-químicas como biológicas (11).

Sin embargo, se requieren estudios que contribuyan a la producción sostenible y con calidad de estos productos biológicos; de ahí que se realice esta investigación con el objetivo de lograr el escalado industrial del biofertilizante Fertilaz y su validación agrícola.

MATERIALES Y MÉTODOS

Fermentación. Las fermentaciones se realizaron con una cepa de *Azotobacter chroococcum* conservada por liofilización, en el cepario de la Empresa Productora de Vacunas Virales y Bacterianas perteneciente al Grupo Empresarial LABIOFAM. En el escalado del proceso fermentativo,

para obtener el biofertilizante, se utilizó un fermentador de 42 L (modelo Techtrics-s, IFORSHT) y uno de 500 litros (modelo MD-500, Marubishi, Japón) de tanques agitados. Se empleó el medio de cultivo optimizado por (12), para esta cepa. La fuente de carbono utilizada contenía 5.6 % de azúcares reductores cuantificados, mediante la técnica del ácido 3.5-dinitrosalicílico (DNS) (13), y el agua un pH de 7.6. La masa de cada macronutriente, para un volumen efectivo (VE) de 35 L, fue de 630 g para la fuente de carbono, 105 g para la fuente de nitrógeno y 112 g para la fuente de fósforo. Para un (Ve) de 350 L, se añadió 10 veces cada nutriente.

Criterios para el escalado del proceso. Para el escalado, se utilizó el método de la Regla del pulgar, que se basa en establecer un criterio de escalado que se mantenga constante durante todo el proceso, a través de las diferentes escalas. Agrupa las variables del proceso en tres categorías: variables químico-físicas, variables geométricas y variables de operación (14-16).

Tabla 1. Características de los fermentadores utilizados para el escalado productivo de la cepa de *Pseudomonas fluorescens*

Fermentador (litros)	Volumen de trabajo efectivo (l)	Número de impulsores	Diámetro del impulsor (cm)	Diámetro del tanque (cm)
42	35	3	8.9	26.7
500	350	2	25	75

Para determinar la condición de similitud geométrica entre las dos escalas se utilizó el Factor geométrico (F_G), según la ecuación 1:

$$F_G = \frac{\sqrt{\frac{D_T}{D_i} + \frac{H_L}{D_i}}}{3} \quad \text{Ec. 1}$$

Dónde:

DT: diámetro del tanque.

HT: altura del líquido.

D: diámetro del impelente.

Se emplearon criterios comprendidos en el método de la Regla del pulgar, cuya utilización no estuviese restringida a la condición de similitud geométrica.

Se determinó la velocidad de agitación (N) y el flujo de aire (Q) y se calcularon las relaciones adimensionales, $\frac{H_T}{D_T}, \frac{H_L}{D_T}, \frac{D_T}{D_i}, \frac{H_L}{D_i}, \frac{D_i}{L_i}, \frac{D_i}{A_i}$ y el factor geométrico F_G , (10).

Para el cálculo de la velocidad de agitación (ecuación 2) se seleccionó el criterio de velocidad en la punta del impelente (ND_i) constante (17, 18).

$$N_2 = N_1 \frac{D_{i1}}{D_{i2}} \quad \text{Ec. 2}$$

Dónde:

N: velocidad de agitación (rpm).

D_i : diámetro del impelente.

Para determinar el flujo de aire, el criterio de velocidad superficial de gas (v_g) constante se empleó la ecuación 3 (17, 18).

$$v_s = \frac{Q}{\frac{\pi}{4} D_T^2} \quad \text{Ec. 3}$$

Y el flujo de aire Q (L/min), según la ecuación 4.

$$Q_2 = Q_1 \left(\frac{D_{T2}}{D_{T1}} \right)^2 \quad \text{Ec. 4}$$

Dónde:

D_T : diámetro del tanque (cm).

Fermentación

Con vistas a corroborar la efectividad de los criterios seleccionados, fue determinado el comportamiento de la cinética de crecimiento en los biorreactores de 42 y 500 L con volúmenes efectivos de 35 y 350 L respectivamente, y un tiempo de 12 horas de fermentación. Se realizaron tres fermentaciones en cada biorreactor. Para cada fermentación se esterilizó el fermentador con todos sus accesorios con vapor a 0.152 MPa, $T=130\pm 1$ °C, durante 40 minutos.

Fermentación de 35 L de volumen efectivo

Obtención del preinóculo. Se prepararon cuatro Erlenmeyers de 1 L de capacidad, con 400 ml de medio de cultivo cada uno y se ajustó el medio a pH=7.6. Se esterilizó en autoclave a 121 ± 1 °C y 0.145 MPa, durante 25 minutos. Luego se adicionaron 10 ml del medio de cultivo a cada tubo de la cepa conservada, se agitó hasta desprender el cultivo y la suspensión de células obtenida y se añadieron dos tubos por cada Erlenmeyers. El preinóculo permaneció en zaranda durante 12 horas a 30 ± 1 °C, a una velocidad de agitación de 220 rpm. Mediante la observación de los caracteres morfológicos de las células bacterianas en la Tinción de Gram se comprobó la pureza del cultivo.

Obtención del inóculo. Se prepararon 4 L de medio de cultivo, a pH 7.6 y se distribuyó en 13 Erlenmeyers de 500 ml, con 300 ml de medio, en cada uno. Fueron esterilizados en autoclave a 121 ± 1 °C y 0.145 MPa, durante 25 minutos. Se inoculó con 30 ml del preinóculo y se incubó en zaranda rotatoria durante 12 horas, a 30 ± 1 °C y 220 rpm. La pureza fue evaluada mediante la Tinción de Gram.

Fermentación de 42 L con volumen efectivo de 35 L

Antes de la fermentación, se esterilizó el fermentador con todos sus accesorios, con vapor, a 0.152 MPa, a la temperatura de 130 ± 1 °C durante 40 minutos y, al alcanzar la temperatura de 30 ± 1 °C, se procedió a realizar el vertimiento del inóculo, se ajustó la presión a 0.101 MPa, aireación de 13 L/min y agitación de 600 rpm. Se determinó el crecimiento celular por DO_{540} , al inicio y cada dos horas. La pureza fue evaluada mediante la Tinción de Gram, se determinó el pH y las Unidades formadoras de colonias (UFC ml^{-1}).

Fermentación en el biorreactor de 500 L con un volumen efectivo de 350 L

Una vez que el fermentador fue esterilizado y, al alcanzar la temperatura de 30 ± 1 °C, se adicionó el medio inóculo, se ajustaron los parámetros para la fermentación, con una aireación de 110 L/min y agitación de 178 rpm. Se determinó el crecimiento celular por DO_{450} , al inicio y cada dos horas. La pureza fue evaluada mediante la Tinción de Gram, se determinó el pH y las Unidades formadoras de colonias (UFC ml^{-1}).

Se realizaron tres corridas experimentales, para cada volumen de fermentación. Con los datos obtenidos de la densidad óptica, se construyó la curva de crecimiento correspondiente a cada una de las fermentaciones, se calculó el promedio y la desviación estándar y se obtuvieron las curvas típicas de crecimiento de la cepa para los dos volúmenes de fermentación (35 y 350 L efectivos). Para los diseños experimentales empleados y los análisis estadísticos realizados se utilizó Statistic Package for Social Science (SPSS) versión XV- Centurión y Microsoft Excel para Windows.

Evaluación del efecto del biofertilizante Fertilaz sobre el crecimiento de las plantas

En el Instituto de Investigaciones de Viandas Tropicales (INIVIT) se realizaron experimentos con el objetivo de evaluar el efecto de la aplicación del biofertilizante en formulación líquida. Las dosis utilizadas fueron a razón de 20L ha⁻¹ en 400 L ha⁻¹ de solución final.

Los estudios para la validación de la efectividad técnica se realizaron a partir de los esquemas de suministro de nutrientes recomendados para los cultivos (19).

Aclimatización de plantas *in vitro* de plátano cv. INIVIT PV 06-30

Se utilizaron plantas completamente desarrolladas con buen vigor. El experimento consistió en evaluar diferentes frecuencias de aplicaciones del biofertilizante sobre el sustrato, cada siete días, se comenzó en el momento de la siembra de las plantas, en bandejas de polietileno de 70 pocillos. Se utilizó el sustrato recomendado para esta etapa (70 % materia orgánica (cachaza) y 30 % suelo rojo).

Tratamientos

- T1 – control (no se aplicó biofertilizante, solo agua)
- T2 – una aplicación del biofertilizante (a los siete ddp)
- T3 – dos aplicaciones del biofertilizante (a los 14 ddp)
- T4 – tres aplicaciones del biofertilizante (a los 21 ddp)
- T5 – cuatro aplicaciones del biofertilizante (a los 28 ddp)

Se utilizaron 60 plantas por tratamiento y, de ellas, se seleccionaron 15, según un diseño completamente aleatorizado, para las evaluaciones de las variables previstas a los 60 días después de plantación (ddp).

Variables evaluadas

Altura de la planta-ALTP (cm), número de hojas abiertas-NHOJ, longitud del pecíolo-LPEC (cm), largo-LHOJ2 y ancho de la hoja (verdadera) No. 2-AHOJ2 (cm), el área foliar de esa hoja (cm²) y la distancia entre las hojas No. 2 y No. 3-DHOJ2-3 (cm).

Los datos se procesaron por SPSS/PC+ versión 15.0 para Windows® (2012). Inicialmente se comprobaron los presupuestos de normalidad y homogeneidad de varianza. Siempre que existieron diferencias entre las medias, la comparación de medias se realizó con la Prueba de Tukey para $P \leq 0.05$.

Aplicación de Fertilaz en presencia de dosis de fertilizantes NPK (9-13-17), en dos cultivares de boniato (INIVIT B-50 y CEMSA-78-354)

Los tratamientos evaluados se muestran en la tabla 2. La dosis de 100 % FC, corresponde a la dosis óptima para el cultivo del boniato en un suelo Pardo mullido carbonatado y están establecidas en el Instructivo técnico para la producción de viandas (12), Fertilaz en su formulación líquida se

aplicó al suelo siempre en horas tempranas en dos momentos: Una primera aplicación en el momento de la plantación y la otra en el hilo del surco a los 20 días.

Tabla 2. Tratamientos estudiados a partir de la aplicación de Fertilaz y diferentes dosis de fertilizante mineral de la fórmula completa 9-13-17, en el rendimiento de los cultivares de boniato INIVIT B-50 y CEMSA-78-354 en suelo Pardo mullido (20)

Tratamiento	Fórmula completa			<i>Azotobacter chroococcum</i> (20 L ha ⁻¹ en sol. final 400 L ha ⁻¹)
	9	13	17	
	N	P ₂ O ₅	K ₂ O	
	(kg ha ⁻¹)			
Control	0	0	0	-
<i>Azotobacter chroococcum</i>	0	0	0	x
25 % FC (0.19 t ha ⁻¹)	17.1	24.7	32.3	x
50 % FC (0.38 t ha ⁻¹)	34.2	49.4	64.6	x
75 % FC (0.56 t ha ⁻¹)	50.4	72.8	95.2	x
100 % FC (0.75 t ha ⁻¹) IT	67.5	97.5	127.5	x

Legenda: FC = Fórmula completa, IT = Instructivo técnico para la producción de viandas (12).

Se utilizaron esquejes de punta y prepunta de 25-30 cm de longitud, procedentes de bancos de semillas. La plantación se realizó de forma manual en todas las parcelas. Se utilizó una distancia de plantación de 0.9 m x 0.3 m, equivalente a 37 038 plantas ha⁻¹ y con un total de 100 plantas por parcela, distribuidas en un área de 27 m². El área de cálculo por parcela fue de 16.2 m². Con la humedad requerida en el suelo, toda la dosis de fertilizante mineral se aplicó en bandas y tapado a los 25-30 días de la plantación. Los aporques se realizaron a los 10, 20 y 30 días de la plantación. Se ejecutaron cinco riegos durante el ciclo, por aspersión y con una norma parcial de 250 m³ ha⁻¹. El riego se suspendió 15 días antes de la cosecha.

Evaluación

El rendimiento agrícola del boniato (t ha⁻¹) se determinó a los 140 días de la plantación por pesada de las raíces tuberosas, con peso superior a 115 g en el área de cálculo de las parcelas.

Análisis estadístico

Para el boniato la información experimental se procesó estadísticamente, como un diseño en bloque, al azar. Para los dos ensayos se verificaron los supuestos de normalidad y homogeneidad de varianza. Como criterio de comparación entre medias la Prueba de Tukey ($p \leq 0.05$). Se utilizó el paquete estadístico IBM SPSS, versión 15.0 (2012).

Tabla 3. Cálculo de las relaciones adimensionales

Relaciones adimensionales	Fermentador 42 L	Fermentador 500 L
$\frac{H_T}{D_T}$	2.86	1.68
$\frac{H_L}{D_T}$	2.00	1.27
$\frac{D_T}{D_i}$	3.00	3.00
$\frac{H_L}{D_i}$	6.00	3.80
$\frac{D_L}{L_i}$	3.56	3.01
$\frac{D_L}{A_i}$	4.94	4.17
F_G	1.41	1.13

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Fermentación

El análisis de las relaciones adimensionales entre los fermentadores y el factor geométrico (tabla 3) demostró que no tenían similitud geométrica, ya que no permanecían constantes con el paso de una escala a la otra (15).

Se seleccionaron entonces aquellos criterios para el escalado, comprendidos en el método de la Regla del Pulgar, cuya utilización no estuviese restringida a la condición de similitud geométrica (14-16).

$$N_2 = N_1 \frac{D_{i1}}{D_{i2}} \quad \text{Ec. 5}$$

Para el cálculo de la velocidad de agitación (ecuación 5) se seleccionó el criterio de velocidad en la punta del impelente (ND_i) constante, (17, 18).

Dónde:

N: velocidad de agitación (rpm).

D_i : diámetro del impelente.

Para determinar el flujo de aire el criterio de velocidad superficial de gas (v_s) constante (ecuación 6) (17, 18).

$$v_s = \frac{Q}{\frac{\pi}{4} D_T^2} \quad \text{Ec. 6}$$

Dónde:

Q: flujo de aire (L/min)

$$Q_2 = Q_1 \left(\frac{D_{T2}}{D_{T1}} \right)^2 \quad \text{Ec. 7}$$

Dónde:

D_T : diámetro del tanque (cm).

Tabla 4. Resultados de los criterios de escalado

Parámetros	Fermentador (42 L)	Fermentador (500 L)
N (rpm)	600	178
Q (L/min)	13	110
Q (vvm)	0.37	0.31

El valor de la aireación se encuentra en el rango establecido para la fermentación de bacterias (0.1-2 vvm) (21).

Fermentación de 42 y 35 L efectivos

En la figura 1 se aprecia que no existe fase de adaptación del microorganismo a las condiciones del cultivo, la causa de este comportamiento radica en la preparación del preinóculo donde las células son cultivadas bajo las mismas condiciones a las que se enfrentarán en el proceso de fermentación y el momento oportuno para la inoculación, justo cuando el cultivo alcanza la fase logarítmica de crecimiento. La cinética de crecimiento de la cepa de *Azotobacter chroococcum* mostró que la fermentación concluyó a las 12 horas, ya que el valor de absorbancia se mantuvo constante en las últimas mediciones realizadas. Este resultado confirmó que el microorganismo se encontraba en fase estacionaria (22).

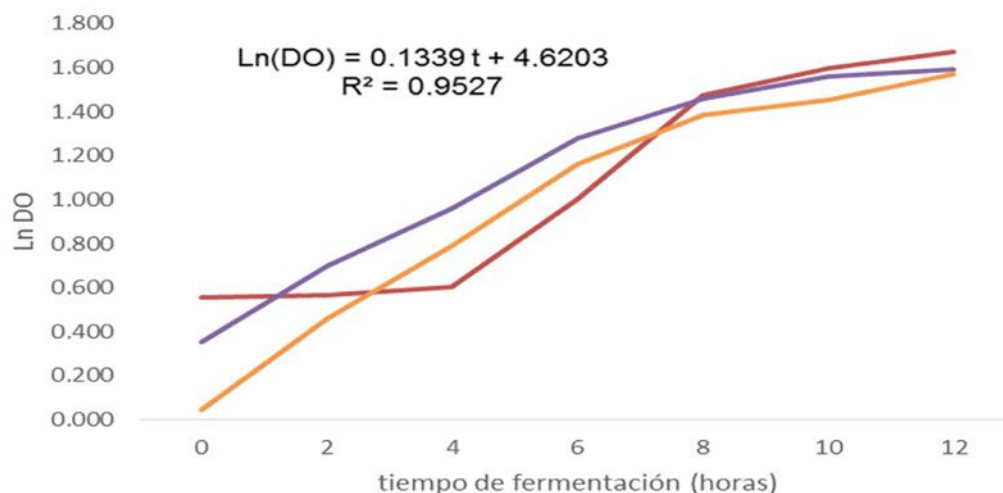


Figura 1. Curvas de crecimiento del *Azotobacter chroococcum* en fermentador de 42 L realizada a una velocidad de agitación de 600 rpm y una aireación de 0.37 vvm.

En las tres fermentaciones se observa que la fase exponencial se desarrolla entre las dos y las doce horas. La media promedio de $\mu_{\text{máx}}$ obtenida es 0.1479 h^{-1} con un 98.97 % de ajuste; teniendo en cuenta resultados de otros investigadores este valor de $\mu_{\text{máx}}$ para el género *Azotobacter chroococcum* es aceptable y comprendido entre $0.10\text{-}0.20 \text{ h}^{-1}$ (23). Se observa el efecto positivo sobre el crecimiento de la bacteria cuando el pH se encuentra sin controlar en el sistema de fermentación tal y como fue observado por Camelo *et al.* (1).

Resultados de viabilidad

Se obtuvo un crecimiento de $1 \times 10^9 \text{ UFCml}^{-1}$, coincidiendo con los valores reportados para esta bacteria que oscilan entre $1\text{-}5 \times 10^9 \text{ UFCml}^{-1}$ (1).

Fermentación de 500 y 350 L efectivos

En el proceso de escalado, en el fermentador de 500 L, se apreció una fase de adaptación en las primeras dos horas del tiempo de fermentación (figura 2). Este resultado se corresponde con el procedimiento utilizado para la preparación del inóculo en este estudio. Fue utilizado el producto de las fermentaciones de 42 L a la hora 11, cuando se encontraba la bacteria en la fase de desaceleración o aceleración negativa, que implica una disminución de la velocidad específica de crecimiento (inferior a la alcanzada en la fase exponencial de crecimiento). A nivel industrial se persigue mantener esta fase inicial lo más corta posible (24).

La media de $\mu_{\text{máx}}$ obtenida es 0.142 h^{-1} con un 97.20 % de ajuste; teniendo en cuenta resultados de otros investigadores este valor de $\mu_{\text{máx}}$ para el género *Azotobacter chroococcum* es aceptable y comprendido entre $0.10\text{-}0.20 \text{ h}^{-1}$ (25).

El rango de pH se mantuvo entre 7.6 y 6.4. El pH no controlado en el sistema de fermentación produjo un efecto positivo para el crecimiento de la bacteria que coincide con lo expresado por Camelo *et al.* (1).

El conteo de células obtenido fue de un promedio para las tres fermentaciones de $1 \times 10^9 \text{ UFCml}^{-1}$, este valor confirma un buen crecimiento celular y que la cepa de *Azotobacter chroococcum* ha respondido satisfactoriamente al escalado (25).

La fase de crecimiento exponencial se extendió desde las dos hasta las doce horas. La media de $\mu_{\text{máx}}$ fue de 0.147 h^{-1} con un 98.97 % de ajuste. Estos valores de $\mu_{\text{máx}}$ se correspondieron con los alcanzados en el fermentador de 35 L de VE y se encuentran comprendidos en el rango entre $0.10\text{-}0.20 \text{ h}^{-1}$ (23).

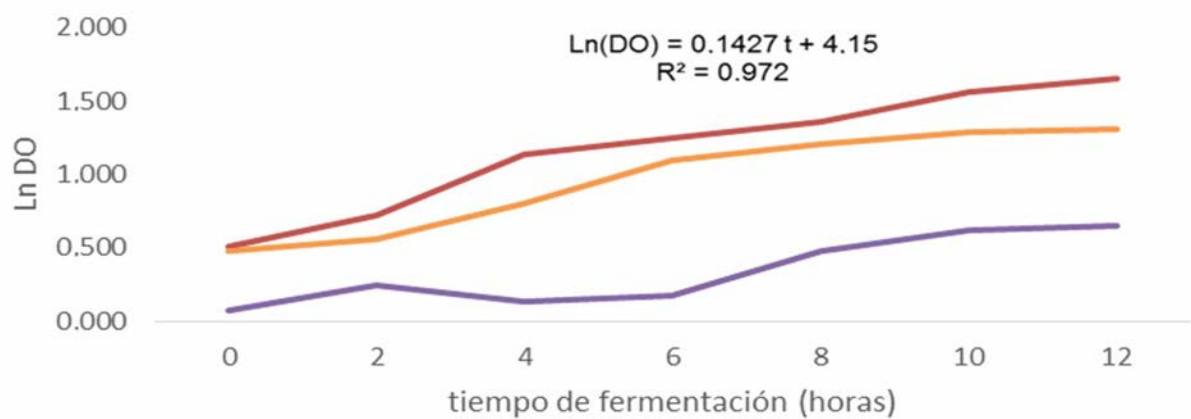


Figura 2. Curvas de crecimiento de *Azotobacter chroococcum* en fermentado de 500 L.

El pH no controlado en el sistema de fermentación produjo un efecto positivo para el crecimiento de la bacteria que coincide con lo expresado por Camelo (1).

La comparación de las velocidades específicas de crecimiento de las fermentaciones mediante la Prueba de rangos múltiples evidenció que no hubo diferencias significativas entre cualquier par de medias, con un 95 % de confianza. El proceso de escalado es uno de los pasos más relevantes para la producción industrial de un microorganismo debido a que se requiere que se mantenga la misma productividad y eficiencia alcanzada. La selección adecuada de los criterios para el escalado debe involucrar variables que se impacten en funciones fisiológicas del microorganismo y se traduzcan en eficiencia del proceso.

Evaluación del efecto del biofertilizante Fertilaz en el crecimiento de plantas

Cultivo de plátano cv. INIVIT PV 06-30

Durante las evaluaciones, a los 60 días después de la plantación, se observó una respuesta positiva en el desarrollo general de las plantas producidas *in vitro*; resultaron visibles diferencias específicas del cultivar, en función de los tratamientos estudiados. La supervivencia siempre fue superior al 98 % para todos los tratamientos. El mejor resultado se correspondió con la variante a la que se realizaron tres aplicaciones, con diferencias estadísticas significativas, respecto al control (sin aplicación). Las especies de *Azotobacter chroococcum* pueden influir en el crecimiento de la planta directamente, sintetizando las hormonas de crecimiento. Estas hormonas no sólo pueden reforzar el crecimiento de la planta y la captación de nutrientes, también pueden proteger, indirecta-

Tabla 5. Efecto del biofertilizante Fertilaz sobre el desarrollo, en fase de aclimatación de plantas de plátano INIVIT PV 06-30 producidas *in vitro*.

TRAT	ALTP	NHOJ	LPEC	DHOJ2-3	LHOJ2	AHOJ2	AFHOJ2 (cm²)
T1 (control)	9.72 c	3.47 b	1.94 b	2.19 b	12.05 c	5.56 c	53.80 d
T2	10.85 c	3.80 ab	2.30 ab	2.08 b	15.47 b	6.14 c	76.41 c
T3	13.28 b	3.85 ab	2.29 ab	2.27 b	17.31 b	7.11 b	99.19 b
T4	15.60 a	4.10 a	2.58 a	2.68 a	20.28 a	8.17 a	133.90 a
T5	13.94 b	4.00 a	2.31 ab	2.27 b	17.23 b	7.36 b	102.14 b
Sx̄	0.415*	0.137*	0.107*	0.115*	0.559*	0.183*	5.300*

* Letras diferentes en cada columna expresan diferencias significativas para P ≤ 0.05, según la Prueba de Tukey.

Leyenda: ALTP: altura de la planta (cm); NHOJ: No. de hojas; LPEC: longitud del pecíolo (cm); LHOJ2: longitud de la hoja No. 2 (cm); AHOJ2: ancho de la hoja No. 2 (cm); AF: área foliar (cm²); DHOJ2-3: distancia entre la hoja No. 2 y la No. 3 (cm). T1- control (sin aplicación); T2- con una aplicación de Fertilaz; T3- con dos aplicaciones de Fertilaz; T4- con tres aplicaciones de Fertilaz; T5- con cuatro aplicaciones de Fertilaz.

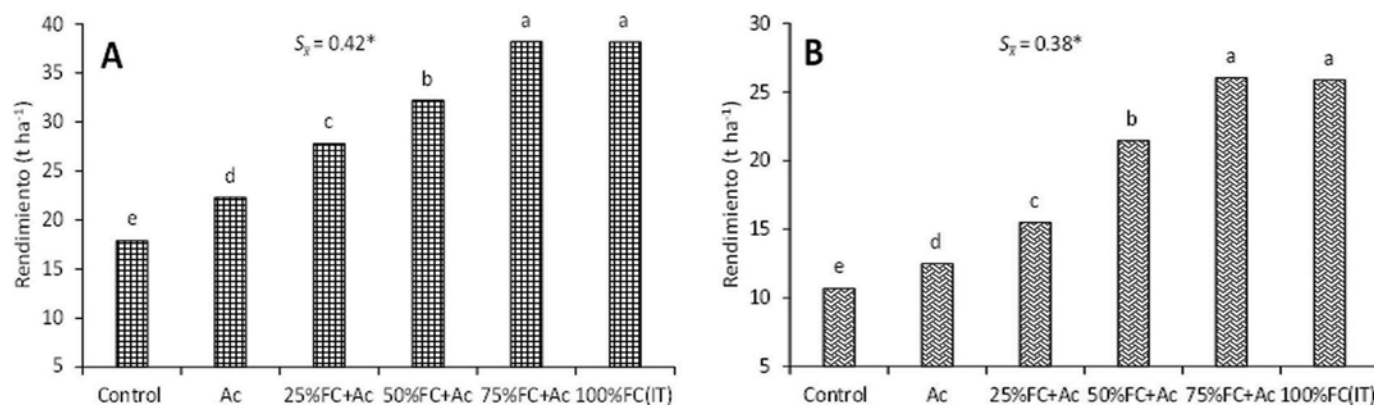
mente, las plantas de los fitopatógenos y pueden estimular otros microorganismos del rhizosphere beneficiosos (26).

La tabla 5 muestra el comportamiento de las variables evaluadas en el cultivar de plátano objeto de estudio. Es evidente que con tres aplicaciones, cada siete días, se obtienen los mejores resultados en cuanto a las variables evaluadas, siempre con diferencias estadísticas significativas respecto al control y al resto de los tratamientos, excepto para las variables número de hojas (NHOJ) y longitud del pecíolo (LPEC).

Cultivo del boniato

En la figura 3 se presenta el efecto de la aplicación de las dosis de fertilizante mineral con la inoculación de Fertilaz y sin ella, en el rendimiento comercial de los cultivares de boniato INIVIT B-50 (A) y CEMSA-354 (B).

Se debe destacar la respuesta positiva en el rendimiento, por aplicar la fertilización mineral en los clones de boniato estudiados. Los mayores rendimientos se obtuvieron con la aplicación conjunta de 75 % FC + AC, sin diferencias significativas con el tratamiento que recibió la dosis mayor de fertilización (100 % FC) y sí con el resto de los tratamientos. El tratamiento que no se fertilizó produjo rendimientos significativamente inferiores, que coincide con lo expresado por Sanchez et.



Letras diferentes implican diferencias significativas a $p \leq 0.05$, de acuerdo con la Prueba de Tukey.

Leyenda: 100 % NPK (9-13-17) = 0.75 t ha^{-1} , Ac. *Azotobacter chroococcum*.

a). (25) en relación con el efecto promotor de crecimiento de *Azotobacter chroococcum* en el cultivo

Figura 3. Evaluación del efecto de las aplicaciones conjuntas de *Azotobacter chroococcum* y diferentes dosis de fertilizante mineral (NPK: 9-13-17), en el rendimiento de los cultivares de boniato INIVIT B-50 (A) y CEMSA-354 (B), a los 140 días de la plantación, en suelo Pardo mullido carbonatado.

del boniato.

CONCLUSIONES

- Las condiciones que maximizaron el proceso de escalado a 500 L fueron agitación 178 rpm, aireación 0.31 vvm y pH no controlado.
- El proceso de fermentación, bajo los conceptos de escalado propuestos, fue satisfactorio y se alcanzó un crecimiento celular de la cepa de *Azotobacter chroococcum*, en el orden 10^9 UFCml⁻¹ a las 12 horas del proceso, con cultivos libres de contaminantes, que se demostró por Tinción de Gram, cada dos horas, durante la fermentación y por siembra en Agar Triptona Soya (ATS) a 30 y 37 °C.

- Se demostró la efectividad de Fertilaz en el desarrollo de plantas de plátano INIVIT PV 06-30, producidas *in vitro*, siempre que se realicen, al menos, tres aplicaciones sobre el sustrato, cada siete días.
- Se obtienen rendimientos altos en boniato con la aplicación de Fertilaz, combinado con menores cantidades de fertilizantes minerales, a partir del empleo de la fórmula completa (9-13-17) en suelo Pardo mullido carbonatado.
- Se disminuye en 25 kg ha⁻¹ la dosis de fórmula completa (0.75 t ha⁻¹), recomendada por el Instructivo técnico para la producción de viandas. Producción de semillas.

AGRADECIMIENTOS

Se agradece a:

- Dirección de Ciencia e Innovación de LABIOFAM
- Facultad de Ingeniería Química de la Universidad Tecnológica de La Habana
- Fondo Financiero de Ciencia e Innovación (FONCI)

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Camelo, M.; Moreno, A.; Romero, F.; Bonilla, R. (2017) Desarrollo de un sistema de fermentación líquida y de enquistamiento para una bacteria fijadora de nitrógeno con potencial como biofertilizante. *Revista Argentina de Microbiología* 49:(3) 289-296.
2. Martínez, F.; García, C.; Gómez, L.; *et al.* (2017) Manejo sostenible de suelos en la Agricultura Cubana. *Agroecología* 12(1): 25-38.
3. Bhardwaj, D.; Ansari, MW.; Sahoo, RK. (2014). Biofertilizers function as key player in sustainable agriculture by improving soil fertility, plant tolerance and crop productivity. *Microb Cell Fact* 13: 66; doi: 10.1186/1475-2859-13-66.
4. Astafyeva, Y.; Shalabayeva, K. (2016) Dependence of *Azotobacter chroococcum* culture growth rate on salt concentrations. *Engineering for Rural Development* 25(27):182-186.
5. Vejan, P.; Abdullah, R.; Khadiran, T.; *et al.* (2016) Role of Plant Growth Promoting Rhizobacteria in Agricultural Sustainability—A Review. *Molecules* 21(5):573; doi: 10.3390/molecules 21050573.
6. Stamenkov, I. S.; Beškoski, V.; Karabegovi, I.; *et al.* (2018) Microbial fertilizers: comprehensive review of current findings and future perspectives. *Spanish Journal of Agricultural*.
7. Kaur, P.; Purewal, S.S. (2019). Biofertilizers and Their Role in Sustainable Agriculture. En: Giri.
8. Nuñez, D.B.; Liriano, R.; Álvarez, J.L.; *et al.* (2013) Resultados de la aplicación de biofertilizantes a base de *Azospirillum* y micorrizas en asociaciones de cultivos hortícolas en condiciones de semiprotegido. *Centro Agrícola* 40(1):23-38.
9. Guerra, G.; Izurieta, B.; Páez, M.A. (2009). Escalado de la producción industrial de levadura de panificación usando dos reactores modelo y un biorreactor prototipo. *Revista Politécnica* 30(1):1-9.
10. Ruiz, A.; Alvarez, H. (2011) Escalamiento de Procesos Químicos y Bioquímicos basado en un modelo Fenomenológico. *Información Tecnológica* 22(6): 33-52.
11. Dunn, I.J.; Heinzle, E.; Ingham, J.; *et al.* (2003). *Biological Reaction Engineering*. WILEY-VCH GmbH & Co, London.
12. Pérez, M.C.; Oramas, J.; Sotolongo, E.; *et al.* (2020). Optimización del medio de cultivo y las condiciones de fermentación para la producción de un biofertilizante a base de *Azotobacter chroococcum*. *Biotecnología Vegetal Vol. 20, No. 3: 189 - 201*, julio - septiembre, 2020 eISSN 2074-8647, RNPS: 2154.

13. Miller, G. (1959). Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar. *Analytical Chemistry* 31: 426-428.
14. San Juan, A.; Pérez, J.; Borges, D.; *et al.* (2010) Escalado de producción en la planta de bioproducto Cuba -10. Dirección de Bioprocesos CUBA-10 IPN, Quivicán.
15. Roque, S.P. Escalado: scale-down. Universidad Nacional de Quilmes 2010.
16. Bañuelos, T.N.O. Diseño y escalamiento de procesos biotecnológicos. Apuntes impresos (Sección biológica). 2010: p:25-39.
17. Aiba, S.; Humphery, A.E.; Mills, N.F. (1973). *Biochemical Engineering*. 2nd Edition Academic Press New York.
18. Quintero, R. (1993) *Ingeniería Bioquímica Teoría y Aplicaciones*. Alhambra Mexicana, DF México.
19. INIVIT (2012) *Instructivo Técnico para la producción de Viandas, Producción de semillas*. Editorial INIVIT, La Habana; ISBN: 978-959- 295-006-1.
20. Hernández, A.; Pérez, J.; Bosch, D.; *et al.* (2015). *Clasificación de los suelos de Cuba 2015*. Ediciones INCA, Mayabeque.
21. McNeal, B.; Harvey, L. (2008). *Practical Fermentation Technology*. JohnWiley & Sons, West Sussex.
22. Kulkarni, N. (2002). Studies on lipase enzyme from *Pseudomonas fluorescens* NS2W. Thesis of doctor of Philosophy in Microbiology, University of Pune, Maharashtra, India.
23. Linqueo, M. (2011). *Diseño de Bio-reactores, Escalamiento de Biorreactores*. Rev. Fermentación e Ingeniería Metabólica.
24. Alí, S.; Faiq, A.; Sameer, M.; *et al.* (2018). A Review Scale Up Fermentation Procedure. *Int J S Res Sci Tech* (4)5: 1301-1307.
25. Franco, G. (2014). *Obtención y evaluación de un preparado líquido como promotor del crecimiento de cultivos de tomate (Solanum lycopersicum L) empleando la bacteria Gluconacetobacter diazotrophicus* [Tesis Doctoral]: Universidad de Caldas Manizales; Colombia.
26. Arora, M.; Saxena, P.; Abdin, M.Z.; *et al.* (2018) Interaction between *Piriformospora indica* and *Azotobacter chroococcum* governs better plant physiological and biochemical parameters in *Artemisia annua* L. plants grown under *in vitro* conditions. *Symbiosis* 75: 103-112.