

15

# Desarrollo tecnológico de biofertilizantes en Colombia: experiencia en AGROSAVIA

Andrés Díaz García<sup>1</sup>  
Martha Isabel Gómez Álvarez<sup>1</sup>  
Ginna Milena Quiroga Cubides<sup>1</sup>  
Erika Paola Grijalba Bernal<sup>1</sup>  
María Margarita Ramírez Gómez<sup>2</sup>  
Mauricio Camelo Rusinque<sup>3</sup>  
Ruth Rebeca Bonilla Buitrago<sup>3</sup>

- 
1. Bioproductos y Bioprocesos Agropecuarios. Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria AGROSAVIA. Sede Central. Cundinamarca. Colombia.
  2. Raíces del Futuro. Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria AGROSAVIA. Sede Central. Cundinamarca. Colombia.
  3. Sistemas Agropecuarios Sostenibles. Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria – AGROSAVIA. Centro de Investigación Tibaitatá. Cundinamarca. Colombia.





# Introducción

El desarrollo tecnológico de biofertilizantes requiere el trabajo en equipo de especialistas en diversas disciplinas que abarcan la biología, la ingeniería agrícola, la microbiología, la ingeniería química y la química farmacéutica, entre otras, con el fin de aplicar sus conocimientos y experiencia en las diferentes etapas de investigación en campo, laboratorio y planta piloto. Desde hace más de veinte años, en

AGROSAVIA se han realizado trabajos de investigación con microorganismos fijadores de nitrógeno que han resultado en el registro de bioproductos o inoculantes de alta calidad y elevada eficiencia en diferentes sistemas vegetales. A continuación se describen algunos casos de estudio asociados a las etapas de producción por fermentación y formulación de biofertilizantes en el contexto nacional.

## Caso de estudio AGROSAVIA: diseño de una formulación sólida a base de *Bradyrhizobium japonicum* (J96) para su uso en soya

Existe una gran cantidad de soportes o portadores para inoculantes, entre los cuales se conocen el cuarzo, arenas, arcillas, materiales inertes, el bagazo y la turba (Ben Rebah et al., 2007; Brockwell et al., 1988; Daza et al., 2000; Roughley, 1970; Smith, 1992; Stephens & Rask, 2000). Las turbas son los materiales más comúnmente utilizados en el mundo para la producción de inoculantes (Hartley et al., 2005; Smith, 1995).

En Colombia, la consecución de turbas aptas para este propósito es limitada, de manera tal que son pocos los materiales que se tienen identificados como promisorios. Por esta razón, se evaluaron dos materiales turbosos denominados La Selva y La Laguna, debido a su alta capacidad de retención de humedad, ausencia de elementos tóxicos, facilidad de esterilización, adecuada aireación y fácil manejo en su producción y en su aplicación en campo, además de que permiten una fácil liberación de la bacteria en campo y son de bajo costo (Bashan, 1998; Ben Rebah et al., 2002; Burton, 1981; Denardin & Freire, 2000; Hartley et al., 2005; Munévar, 1989; Smith, 1995).

Se establecieron experimentos de evaluación del soporte o portador con la cepa *Bradyrhizobium japonicum* ICA J01 durante un periodo de 30 días,

tomando como testigo el portador convencional (turba La Selva). De igual manera, utilizando los dos portadores, se adelantaron pruebas de supervivencia de la cepa *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* ICA T13, por el método de infección de plantas, durante 230 días. Los portadores fueron esterilizados en autoclave antes de preparar los inoculantes, y con cada uno se hicieron tres bolsas de inoculantes (réplicas), para cada especie de rizobio, y la supervivencia del microorganismo se determinó por recuento en placa.

Las dos evaluaciones descritas demostraron que el portador La Laguna ofrece condiciones que permiten el mismo nivel de supervivencia de los rizobios que el portador La Selva (tabla 15.1). Para ambos portadores, los recuentos de células después de 6 meses de preparación del inoculante superaron los valores exigidos por las normas de calidad internacionales (de 100 a 1.000 millones de células por gramo). Lo anterior permitió concluir que la utilización de los dos portadores, La Selva o La Laguna, es adecuada para la producción de inoculantes. Estos resultados aportaron una solución tecnológica para superar un factor limitante en la producción de inoculantes, como lo es la selección de un portador eficiente.

■ **Tabla 15.1.** Tiempo de supervivencia de *Bradyrhizobium japonicum* ICA J01 y *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* ICA T13 (log UFC g<sup>-1</sup>) sobre dos tipos de turba  
Fuente: Munévar (1989)

Tiempo del inoculante (días)	<i>B. japonicum</i>		<i>R. leguminosarum</i> bv. <i>trifolii</i>	
	La Selva	La Laguna	La Selva	La Laguna
0	7,74	7,69	>7,84	>7,84
7	9,78	9,43	7,60	7,41
14	9,77	9,61	ND	ND
21	ND	ND	8,34	8,10
30	9,49	9,42	7,00	7,50
60	9,76	9,87	7,65	7,23
90	9,86	9,88	>8,84	>8,84
120	9,83	9,65	ND	ND
140	ND	ND	9,53	9,37
160	9,87	9,93	ND	ND
180	9,77	9,69	ND	ND
200	ND	ND	9,10	9,22
230	ND	ND	9,56	9,68
300	9,90	9,74	ND	ND

Nota: ND: No determinado.

A pesar del importante papel que juegan las leguminosas para la economía de Colombia, el uso de inoculantes no había tenido una amplia adopción, en gran medida debido a la falta de inoculantes de buena calidad en el mercado. Desde 1985 se identificó la necesidad de contar en el país con una

producción nacional de inoculantes para leguminosas que fuera satisfactoria para nuestras necesidades, para lo cual el Estado, a través del Instituto Colombiano Agropecuario (ICA), inició la producción de estos fertilizantes biológicos con una alta aceptación en los productores.

# Caso de estudio AGROSAVIA: diseño de una formulación líquida a base de *B. japonicum* (J96) para su uso en soya

Aunque los inoculantes sólidos favorecen la supervivencia en el suelo de las bacterias simbióticas fijadoras de nitrógeno del género *Bradyrhizobium* sp., el uso de turbas u otros soportes similares presenta limitaciones desde el punto de vista de la sostenibilidad a largo plazo, por ser recursos no renovables; además, cuando la siembra es mecanizada, es preferible tratar las semillas con

inoculantes líquidos de alta densidad celular (Menéndez et al., 2014), y este tipo de formulación facilita el manejo del bioproducto, tanto para peletización de semillas como para su aplicación en campo en numerosos sistemas vegetales. Por tanto, el desarrollo de formulaciones líquidas estables en el tiempo, bajo diferentes condiciones de almacenamiento, ha adquirido un renovado interés.

## Desarrollo del medio de cultivo para *B. japonicum*, cepa J96

La fermentación de *B. japonicum* (J96) se llevó a cabo en erlenmeyers de 1 L con un volumen efectivo de trabajo (VET) de 750 mL. Como medio de fermentación, se utilizó el caldo extracto de levadura-manitol (YMA), que fue inoculado con una suspensión del microorganismo ajustada en  $1 \times 10^9$  UFC mL<sup>-1</sup>, en una relación del 12 % v/v del VET, y se dejó en incubación a una temperatura

de  $28 \pm 2$  °C y a 150 rpm por 7 días. Después de este tiempo, se evaluó la viabilidad de *B. japonicum* mediante recuento en placa en agar YMA, así como el pH, mediante un potenciómetro Hanna Checker A. Para los diferentes lotes de producción obtenidos, la viabilidad se encontró en el rango de  $1,5 \times 10^9$  a  $1,7 \times 10^9$  UFC mL<sup>-1</sup>, y el pH, entre 5,96 y 6,34.

## Desarrollo de la formulación a base de *B. japonicum*, cepa J96

A partir de una revisión de la literatura, se seleccionaron los coadyuvantes por incluir en el diseño de una suspensión acuosa. Entre las sustancias utilizadas, se consideraron las siguientes: a) viscosantes o adherentes, que ayudan a que el microorganismo se adhiera a las semillas de soya, además de que pueden proteger a las bacterias de la desecación después de la aplicación y, de esta manera, contribuir a su eficacia; b) reductores de actividad de agua, que disminuyen la cantidad de agua metabólicamente disponible para ser utilizada por el microorganismo, sin causar la muerte de este, y que, al detener su crecimiento y reducir su metabolismo, pueden otorgarle mayor estabilidad durante el almacenamiento; c) los emulsificantes, que mejoran la homogeneidad de la suspensión, evitando la formación de agregados del principio activo y permitiendo que la concentración sea uniforme.

Posteriormente, se llevó a cabo una prueba de compatibilidad de los coadyuvantes seleccionados, realizando una mezcla binaria con *B. japonicum* (J96) (coadyuvante-microorganismo) a dos concentraciones diferentes, determinando el número de unidades formadoras de colonia (UFC mL<sup>-1</sup>) después de 7 días de incubación a temperatura ambiente. Finalmente, para seleccionar los coadyuvantes por incluir en la formulación, se planteó una matriz de decisión en la que se tuvieron en cuenta tres criterios: la compatibilidad de las sustancias con *B. japonicum*, la carga microbiana del coadyuvante y el costo de las sustancias. Después de la selección de los coadyuvantes, se diseñaron 12 prototipos de formulación que fueron elaborados adicionando al caldo de fermentación de *B. japonicum* (J96) el reductor de actividad de agua, los

emulsificantes y el regulador de pH. Esta mezcla se realizó con un homogeneizador Bar-Spin Orto Alresa a 500 rpm, aproximadamente, durante 2 minutos, se adicionó el viscosante y se sometió nuevamente a agitación, hasta completar la homogeneización. Cada prototipo de formulación se caracterizó a nivel microbiológico y físico-químico. Para el primer caso, se evaluó la viabilidad del microorganismo mediante

recuento en placa en agar YMA, y, para el segundo, se determinó tanto el pH, mediante un potenciómetro Hanna Checker A, como la actividad de agua ( $A_w$ ), con un *thermoconstanter* Novasina MS1- $A_w$ . Los prototipos obtenidos se dejaron en almacenamiento a temperatura ambiente ( $18 \pm 2$  °C) durante un mes, tiempo después del cual se evaluó nuevamente la viabilidad, el pH y la  $A_w$  (tabla 15.2).

■ **Tabla 15.2.** Composición y características de los prototipos de formulación (suspensiones acuosas) a base de *B. japonicum* (J96)  
Fuente: Elaboración propia

Prototipo	Característica			
	pH	$A_w$	Concentración (UFC mL <sup>-1</sup> )	
			Tiempo 0	Tiempo 1 (un mes de almacenamiento)
<b>P1</b>	6,42	0,92	$1,60 \times 10^9$	$1,30 \times 10^8$
<b>P2</b>	6,62	0,90	$1,70 \times 10^9$	$1,07 \times 10^9$
<b>P3</b>	6,35	0,93	$2,10 \times 10^9$	$2,50 \times 10^7$
<b>P4</b>	6,66	0,91	$1,50 \times 10^9$	$3,30 \times 10^8$
<b>P5</b>	6,40	0,92	$1,80 \times 10^9$	$2,60 \times 10^8$
<b>P6</b>	6,30	0,91	$1,13 \times 10^9$	$9,50 \times 10^7$
<b>P7</b>	6,47	0,94	$1,90 \times 10^9$	$1,20 \times 10^9$
<b>P8</b>	6,47	0,92	$1,40 \times 10^9$	$< 1,00 \times 10^7$
<b>P9</b>	6,58	0,94	$1,75 \times 10^9$	$1,30 \times 10^7$
<b>P10</b>	6,67	0,94	$1,92 \times 10^9$	$2,50 \times 10^7$
<b>P11</b>	6,75	0,94	$2,30 \times 10^9$	$2,00 \times 10^9$
<b>P12</b>	6,24	0,91	$1,30 \times 10^9$	$1,20 \times 10^8$

A partir de los resultados obtenidos, se seleccionaron tres prototipos, denominados P2, P7 y P11, ya que después de un mes de almacenamiento a temperatura ambiente mantuvieron estable la concentración de *B. japonicum* (J96).

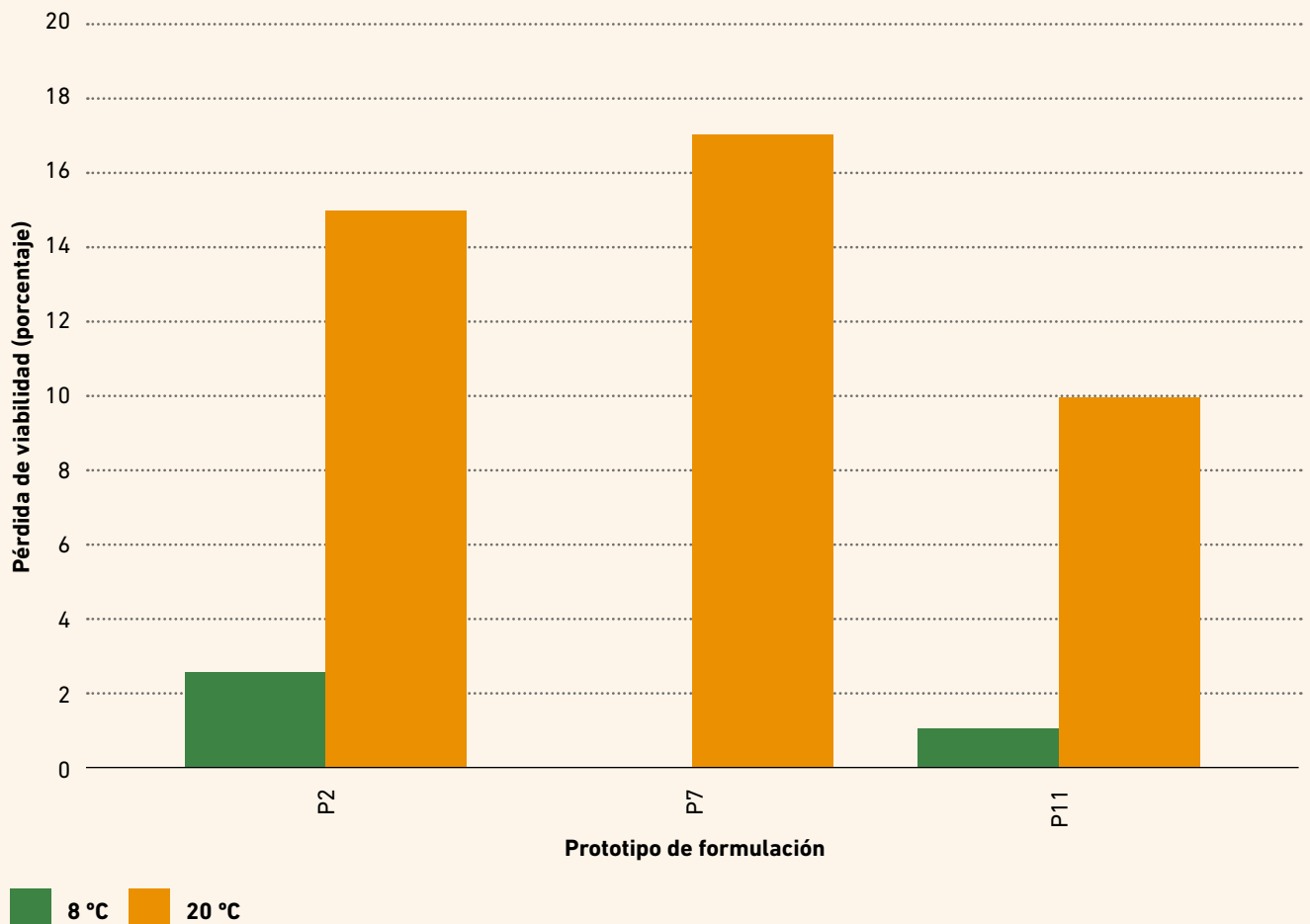
Estos prototipos fueron sometidos a un estudio de estabilidad durante 4 meses, almacenándolos a  $8 \pm 2$  °C y  $18 \pm 2$  °C. Cada mes se tomaron muestras de cada prototipo, a las que se les evaluó la viabilidad, mediante recuento en placa en LMA, y el pH. Asimismo, se evaluó la actividad biológica sobre la semilla de soya, para lo cual se determinó la biomasa, expresada como el peso seco radical y foliar; la longitud radical y foliar, y la cantidad de nódulos formados. Para esto, los prototipos fueron aplicados sobre 10 g de semilla de soya, variedad Superior 6 y línea 29, y estas se dejaron secar a temperatura ambiente, durante 6 horas,

antes de sembrarlas. La evaluación de las variables planteadas para determinar la actividad biológica se llevó a cabo 45 días después de la siembra.

Los resultados de viabilidad obtenidos se expresaron como pérdida de esta después de 4 meses de almacenamiento a las dos temperaturas evaluadas (Figura 15.1). En general, se observó el efecto de la temperatura sobre los prototipos evaluados, siendo menor la pérdida de viabilidad a  $8 \pm 2$  °C en comparación con la temperatura a  $18 \pm 2$  °C. A esta última temperatura, el prototipo P11 presentó una pérdida de viabilidad significativamente menor en comparación con P2 y P7 ( $p < 0,005$ ). Con respecto al pH, el prototipo P7 fue el más estable a las dos temperaturas de almacenamiento, con una variación entre 5,92 y 5,61 a  $8 \pm 2$  °C y entre 5,92 y 5,52 a  $18 \pm 2$  °C. En contraste, los prototipos P2 y P11 redujeron su valor de pH en más de una unidad después del tiempo de 4 meses de almacenamiento a las dos temperaturas evaluadas.

■ **Figura 15.1.** Pérdida de viabilidad de tres prototipos de formulación (suspensiones acuosas) almacenados a  $8 \pm 2$  °C y  $18 \pm 2$  °C durante 4 meses.

Fuente: Elaboración propia



Finalmente, al evaluar en plantas de soya la actividad biológica con los tres prototipos —frescos (recién preparados) y después de 4 meses de almacenamiento—, se observó un mayor desarrollo de las plantas, expresado en longitud foliar y radical, al igual que una mayor formación de nódulos, en comparación con el testigo absoluto, en el que no se adicionó ningún tipo de fertilización. Estos resultados evidenciaron que con los tres prototipos se mantuvo la actividad biológica de *B. japonicum* (J96) y que su aplicación ejerce un efecto positivo sobre las plantas, tanto en su desarrollo como en la formación de las estructuras típicas de los rizobios (nódulos), que son las que les permiten establecerse en la raíz y realizar la fijación de nitrógeno. Este proceso es mediado por un complejo enzimático denominado *complejo nitrogenasa*, convirtiendo el nitrógeno gaseoso ( $N_2$ ) en amoníaco ( $NH_3$ ) o nitrato ( $NO_3^-$ ) para hacerlo asimilable por la planta. Teniendo en cuenta los resultados del estudio de estabilidad, en los que no hay un efecto del almacenamiento sobre la actividad biológica del microorganismo en ninguno de los tres prototipos de formulación, y que el prototipo P11 mantuvo el valor de pH estable a las dos temperaturas de almacenamiento durante los 4 meses de evaluación, se decidió seleccionar este prototipo para continuar su evaluación en condiciones de campo.

Hoy en día, la práctica de inoculación con rizobios en soya está ampliamente difundida entre los productores. Desde 2017 AGROSAVIA ha medido el impacto del uso de bacterias fijadoras de nitrógeno en soya y ha encontrado ventajas ambientales, sociales y económicas en el uso de esta tecnología. Ambientalmente, la disminución del uso de urea mejora la calidad de los suelos y reduce el uso de maquinaria agrícola; económicamente, el costo de producción se reduce en un 9%, y el rendimiento por ciclo productivo en la altillanura colombiana es superior en un 20% con respecto a cultivos sin inoculación. Según el *Balance social 2017* de AGROSAVIA, ese año se presentó un beneficio económico para los productores de 16.000 millones de pesos, y para 2018 se estimó que el beneficio económico adicional para los productores de soya en la altillanura por el uso de rizobios fue superior a los 17.000 millones de pesos. En ambos años, el uso de la biotecnología presentó un impacto ambiental positivo, debido a la sustitución de fertilizantes nitrogenados de síntesis química por los biofertilizantes.



# Caso de estudio AGROSAVIA: diseño de una formulación sólida de Monibac (*Rhizobium* sp. AC1 y *Agrobacterium pusense* AC10) para su uso en algodón

Las prácticas agrícolas inadecuadas, entre las que se encuentra el uso indiscriminado de fertilizantes químicos, han causado una reducción en la capacidad productiva de los suelos, debido principalmente a la degradación de sus características físicas, químicas y biológicas. Por esta razón, el uso de biofertilizantes ha tomado cada vez más relevancia como complemento a la fertilización química. La utilización de microorganismos benéficos nativos asociados a las plantas que se han estudiado —en el caso de AGROSAVIA— ha permitido la liberación de nutrientes inorgánicos, lo que se ve reflejado en una productividad sostenible al reducir la fertilización de síntesis nitrogenada y fosfórica (Camelo-Rusique et al., 2017).

## Aislamiento del principio activo

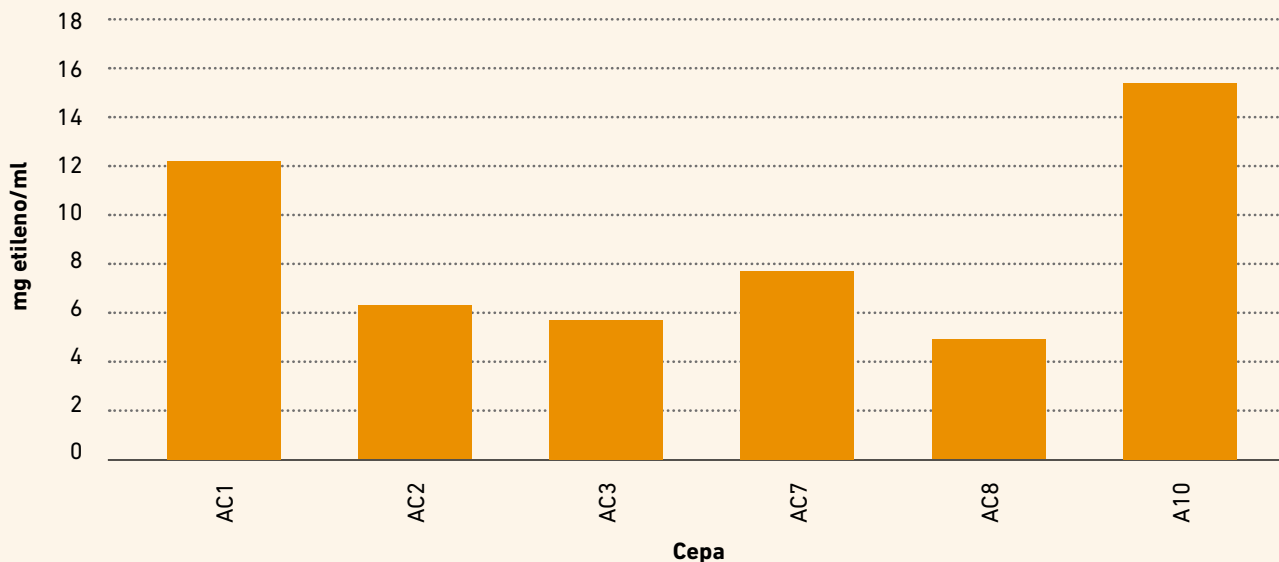
Teniendo en cuenta la anterior premisa, AGROSAVIA tomó la determinación de desarrollar un biofertilizante con la capacidad de fijar el nitrógeno presente en la atmósfera, para ser comercializado principalmente en el sector algodonero de nuestro país. La búsqueda de estas bacterias fue realizada a través de un proceso de bioprospección en suelos destinados al cultivo del algodón, en el Caribe seco colombiano (Rivera et al., 2010). La principal bacteria encontrada en esos suelos fue *Azotobacter* sp., que es un microorganismo habitante regular del suelo, fijador de nitrógeno y productor de sustancias promotoras del crecimiento vegetal. Este microorganismo se encuentra generalmente asociado a la rizósfera (zona de las raíces) y a las hojas (filósfera) de muchas plantas, y es capaz de generar estructuras de resistencia especiales, llamadas *quistes*. Varias investigaciones a nivel mundial han demostrado que el uso

de esta bacteria en el suelo ayuda a reducir la fertilización nitrogenada en un 40% y a incrementar los rendimientos de producción hasta un 25%, principalmente en cultivos de hortalizas, pero también se han demostrado efectos positivos en tomate, trigo, papa y girasol; asimismo, *Azotobacter* es capaz de fijar al menos 10 mg de N<sub>2</sub> por gramo de carbohidrato (Paredes, 2013).

Inicialmente fueron aisladas 20 bacterias presuntivas del género *Azotobacter* sp., con la capacidad de fijar nitrógeno atmosférico, de las cuales se seleccionaron 6 por su rendimiento en el ensayo de reducción de acetileno (ARA), en la que las cepas AC1 y AC10 demostraron tener la mayor capacidad fijadora de nitrógeno bajo condiciones de laboratorio (Figura 15.2).



- **Figura 15.2.** Resultados del ensayo de reducción de acetileno (ARA) bajo condiciones de laboratorio.  
Fuente: Elaboración propia



## Medio de cultivo alternativo para la multiplicación de *Azotobacter chroococcum*

La multiplicación de las bacterias pertenecientes al género *Azotobacter* se ha realizado tradicionalmente en caldo Ashby (Escobar et al., 2011), el cual permite evidenciar las características morfológicas principales del género y ha demostrado un aceptable nivel de producción de biomasa, alcanzando hasta  $1 \times 10^8$  UFC mL<sup>-1</sup>, dependiendo de las condiciones de fermentación aplicadas. Sin embargo, la formulación de este medio de cultivo es costosa, razón por la cual fue necesario el desarrollo de un medio de cultivo alternativo para la multiplicación y desarrollo de la bacteria, con el objetivo de que pudiera llegar al productor a un precio razonable. Para lo anterior, se seleccionaron varias

fuentes nutricionales de bajo costo, como el azúcar cristalizada, la levadura y las sales de grado industrial o alimenticio. Como resultado, se obtuvo el medio de cultivo líquido Agrícola (Bonilla Buitrago & Morales, 2005), que demostró ser más eficiente que el caldo Ashby, ya que con aquel se obtuvieron niveles de producción de biomasa un 20% más altos. Además, el medio Agrícola permitió tener procesos de fermentación más rápidos, ya que el máximo de biomasa era obtenido en 48 horas de proceso, frente a las 72 que requería el medio convencional. En la tabla 15.3 se pueden observar las diferencias de producción de biomasa entre los dos medios de cultivo para las cepas AC1 y AC10.

- **Tabla 15.3.** Comparación de la producción de biomasa entre el medio de cultivo convencional y el medio Agrícola para *Rhizobium* sp. AC1 y *Agrobacterium pusense* AC10.  
Fuente: Elaboración propia

### 1 Medio de cultivo: Ashby (72 horas)

AC1:  $1,45 \times 10^7$  UFC mL<sup>-1</sup>

AC10:  $1,23 \times 10^7$  UFC mL<sup>-1</sup>

### 2 Medio de cultivo: Agrícola (48 horas)

Con inóculo:  $1,98 \times 10^9$  UFC mL<sup>-1</sup>

Sin inóculo:  $1,67 \times 10^9$  UFC mL<sup>-1</sup>

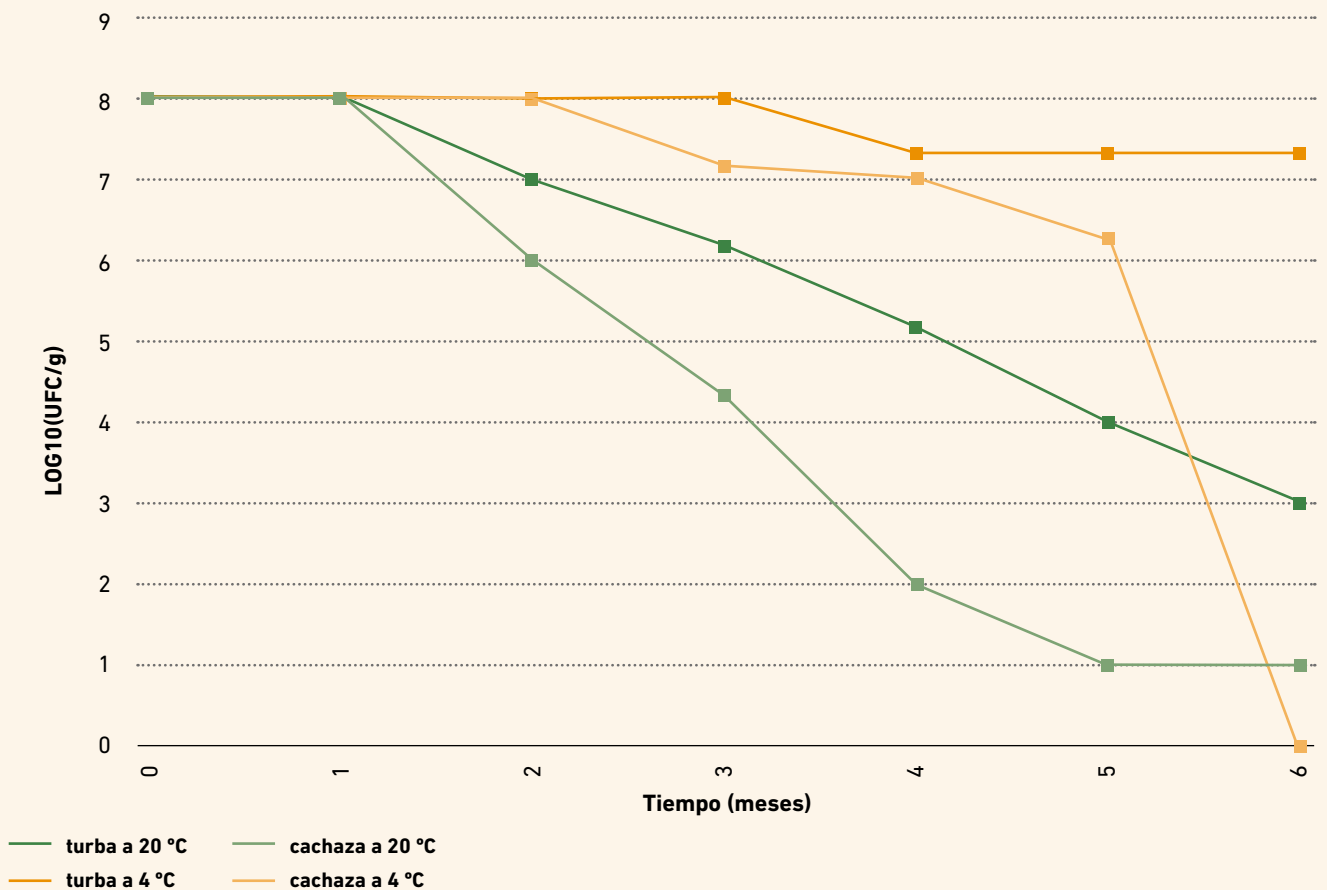
# Selección del vehículo de inoculación

Como parte de la estrategia de desarrollo del biofertilizante, se realizó la evaluación de diferentes soportes sólidos, como la turba y la cachaza suplementada (melaza al 1%). Estos materiales demostraron ser ideales para el mantenimiento de las bacterias en el tiempo (6 meses) bajo almacenamiento en condiciones de refrigeración (4-8 °C). En la Figura 15.3 se observa el comportamiento de los dos soportes en una

prueba acelerada de estabilidad a temperatura ambiente y en refrigeración. Los resultados demostraron que la turba fue el mejor soporte para mantener la viabilidad y actividad biológica de la cepa AC1 durante 6 meses bajo condiciones controladas de refrigeración, por lo que es el soporte ideal para el desarrollo del biofertilizante (Bonilla Buitrago & Morales, 2005).

- **Figura 15.3.** Curvas de estabilidad acelerada de la cepa AC1 en dos soportes sólidos y a dos temperaturas diferentes.

Fuente: Elaboración propia



# Caso de estudio AGROSAVIA: diseño de una formulación líquida de Monibac (*Rhizobium* sp. AC1 y *A. pusense* AC10) para su uso en algodón

Para el caso de bacterias no simbióticas fijadoras de nitrógeno del género *Azotobacter* sp., con el uso de formulaciones líquidas no solo se facilita el manejo del bioproducto para su aplicación en la peletización de semillas, sino que también se aprovecha la capacidad de producción de exopolisacáridos durante el proceso de fermentación por parte de *Azotobacter pusense* AC10, para generar formulaciones líquidas simples, que son altamente estables en el tiempo a bajas temperaturas.

## Validación de la línea base del proceso de fermentación

En trabajos previos en el Laboratorio de Suelos de AGROSAVIA, se llevó a cabo el diseño y optimización de un medio de cultivo a escala de laboratorio denominado MBR (Moreno et al., 2011) para la producción de inóculos líquidos de las cepas AC1 y AC10. Para esto, se empleó un biorreactor de tanque agitado (STR, por sus siglas en inglés) marca Infors, modelo Minifors, y se aplicó una estrategia de fermentación discontinua (por lote o *batch*) independientemente para cada cepa. Las condiciones de trabajo establecidas fueron: temperatura: 30 °C; caudal de aire: 1 vvm; velocidad de agitación: 500 rpm; tiempo de fermentación: 24 horas sin control de pH y oxígeno disuelto (tabla 15.4) (Camelo-Rusique et al., 2017); estas condiciones se usaron como línea base de los trabajos posteriores.

Inicialmente, se realizó la validación de la producción del principio activo bajo las condiciones de la línea base en la Planta Piloto de Biofertilizantes de AGROSAVIA (tabla 15.5), y se encontró que la cepa AC1 alcanzó una concentración celular máxima de  $1,71 \times 10^9$  UFC mL<sup>-1</sup> y una velocidad

específica de crecimiento máxima de 0,07 h<sup>-1</sup>, y para la cepa AC10 se obtuvieron resultados similares:  $2,79 \times 10^9$  UFC mL<sup>-1</sup> y 0,10 h<sup>-1</sup>, respectivamente. Adicionalmente, se determinó que la máxima concentración celular se obtenía a las 26 horas de fermentación bajo las condiciones de trabajo determinadas previamente.



■ **Tabla 15.4.** Condiciones de fermentación durante el desarrollo de la producción de *Rhizobium sp.* AC1 y *A. pusense* AC10  
Fuente: Elaboración propia

Variable operacional	Validación de línea base*	Etapa 1*	Etapa 2**	Etapa 3**	Cocultivo**	Relación N/C*
<b>Biorreactor</b>	Infors-Minifors	Infors-Minifors	Biolab 50b	Biolab 50b	Biolab 50b	Infors-Minifors
<b>Tipo de fermentación</b>	<i>Batch</i>	<i>Fed-batch</i>	<i>Fed-batch</i>	<i>Fed-batch</i>	<i>Fed-batch</i>	<i>Fed-batch</i>
<b>Velocidad de agitación</b>	500 rpm	200 rpm	200 rpm	157 rpm	157 rpm	200 rpm
<b>Aireación</b>	1 vvm	1 vvm	1 vvm	1 vvm	1 vvm	1 vvm
<b>Temperatura</b>	30 °C	30 °C	30 °C	30 °C	30 °C	30 °C
<b>Tiempo de fermentación</b>	30 horas	28 horas	26 horas	26 horas	26 horas	26 horas
<b>Volumen inicial</b>	3,50 L	1,15 L	28,50 L	32,00 L	32,00 L	2,50 L
<b>Volumen final</b>	3,50 L	3,50 L	45,00 L	50,00 L	50,00 L	3,50 L

\* Escala de laboratorio; \*\* escala piloto.



■ **Tabla 15.5.** Parámetros de eficiencia y cinéticos durante el desarrollo de la producción de *Rhizobium* sp. AC1 y *A. pusense* AC10

Fuente: Elaboración propia

Etapa	Cepa	Viabilidad celular ( $10^9$ ufc mL <sup>-1</sup> )	Productividad máxima (log [ufc mL <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup> ])	Rendimiento biomasa-sustrato (g g <sup>-1</sup> )	Velocidad específica de crecimiento máxima (h <sup>-1</sup> )
Validación de línea base	AC1	1,71 ± 0,12	0,355 ± 0,001	ND	0,071 ± 0,001
	AC10	2,79 ± 0,79	0,363 ± 0,005	ND	0,100 ± 0,005
Escalamiento: Etapa 1	AC1	4,25 ± 0,18	0,370 ± 0,001	ND	0,068 ± 0,012
	AC10	4,21 ± 0,59	0,370 ± 0,002	ND	0,063 ± 0,012
Escalamiento: Etapa 2	AC1	3,71 ± 0,21	0,368 ± 0,001	0,54 ± 0,02	0,044 ± 0,002
	AC10	3,46 ± 0,16	0,382 ± 0,001	0,60 ± 0,01	0,044 ± 0,046
Escalamiento: Etapa 3	AC1	4,21 ± 0,26	0,370 ± 0,001	0,48 ± 0,00	0,065 ± 0,003
	AC10	4,04 ± 0,29	0,370 ± 0,001	0,55 ± 0,00	0,061 ± 0,002
Ajuste: cultivo	AC1 AC10	16,6 ± 9,80	0,393 ± 0,001	0,47 ± 0,00	0,085 ± 0,001
Ajuste: relación N/C	AC1 AC10	22,0 ± 1,18	0,399 ± 0,001	1,18 ± 0,02	0,131 ± 0,016

Nota: ND: No determinado.

## Diseño de la estrategia de escalamiento

Para cumplir eficazmente con el objetivo de producir a escala de planta piloto la biomasa de las dos cepas mediante fermentación líquida, y con el fin de mejorar los parámetros de eficiencia del proceso, se planteó una estrategia de escalamiento convencional. Para ello, se aplicó un criterio basado en la similitud geométrica entre los equipos a escala de laboratorio y a escala de planta piloto, asociado con la relación geométrica entre la altura y el diámetro del tanque ( $H/D$ ) (tabla 15.6 y Figura 15.4).

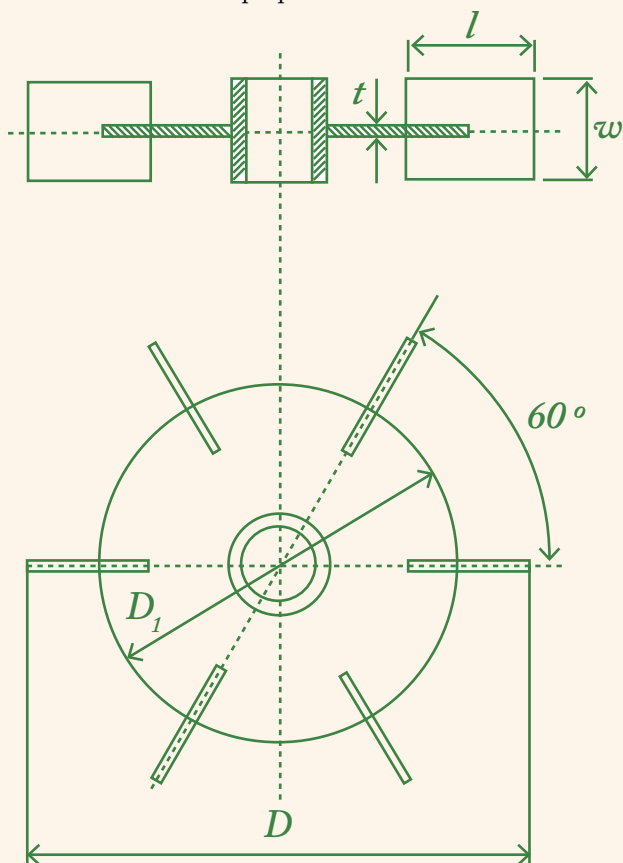


- **Tabla 15.6.** Caracterización geométrica de los biorreactores de tanque agitado (STR) empleados para la estrategia de escalamiento para la fermentación de *Rhizobium sp.* AC1 y *A. pusense* AC10  
Fuente: Elaboración propia

Característica	Biorreactor Infors-Minifors	Biorreactor Biolab 50b
Diámetro del tanque (D)	14,0 cm	34,0 cm
Altura del tanque (H)	34,0 cm	83,0 cm
Volumen total	5,0 L	70,0 L
Volumen de trabajo	3,5 L	52,5 L
Tipo de impulsor	Rushton	Rushton
Número de impulsores	2	2
Diámetro del impulsor (Di)	5,9 cm	10,5 cm
Relación $H/D$	2,43	2,44

■ **Figura 15.4.** Esquema de un impulsor tipo Rushton y sus relaciones geométricas características.

Fuente: Elaboración propia



Posteriormente, se hicieron ajustes en las condiciones de operación y se aplicó un criterio de similitud fluidodinámica. Esta estrategia se realizó en tres etapas:

**Etap 1.** Ajuste preliminar a escala de laboratorio evaluando la disminución de la variable operacional de velocidad de agitación y la aplicación de una estrategia de alimentación *fed-batch*. Las condiciones de operación de la línea base (500 rpm, 1 vvm) implicaban un elevado consumo energético asociado a la potencia entregada al líquido gaseado por los impulsores y un posible exceso de oxígeno que no alcanza a ser utilizado por los microorganismos a escala de laboratorio, ineficiencias que llegarían a ser aún más restrictivas en el escalamiento a escala piloto. Por lo tanto, en esta etapa se evaluó el efecto de una disminución del 60% en la velocidad de agitación, manteniendo el mismo caudal de aire, a escala de laboratorio (tabla 15.5). También se aplicó una estrategia de alimentación *fed-batch* del sustrato limitante (fuente de carbono) de tres pulsos, para evitar inhibición del crecimiento por

sustrato y maximizar la producción de biomasa. Esto, a su vez, redujo el consumo energético en un 96,9% con respecto a la línea base por la disminución en el volumen inicial de trabajo. Con respecto al consumo de aire, este se redujo en un 22% para todo el proceso, con parámetros de eficiencia similares a los obtenidos con la línea base (tabla 15.5).

**Etap 2.** Ajuste y validación de la estrategia de alimentación a escala piloto, previa verificación de la similitud geométrica de los biorreactores utilizados. Se identificó que los valores de la relación geométrica  $H/D$  de los biorreactores usados en las dos escalas fueran similares (tabla 15.6), lo que satisfaría la semejanza geométrica. El factor volumétrico de escala fue de 14, que correspondió a la relación entre los volúmenes de trabajo del biorreactor a escala de laboratorio y el de la escala piloto. Se procedió a desarrollar las fermentaciones a escala piloto manteniendo la velocidad de agitación determinada en la etapa 1 y se evaluó una estrategia de alimentación de sustrato de un solo pulso para simplificar la logística y disminuir la posibilidad de contaminación del cultivo. Así, se concluyó que la estrategia de alimentación *fed-batch* a escala piloto permitió mantener la concentración celular observada a nivel de laboratorio, ya que no se presentaron diferencias significativas entre las dos escalas (tabla 15.5). Esto asegura la repetibilidad y reproducibilidad en producciones comerciales, con respecto a los parámetros de eficiencia del proceso a escala industrial (Lim & Shin, 2013; Qu et al., 2013; Shay et al., 1987).

**Etap 3.** Ajuste y validación de la estrategia de escalamiento aplicando dos criterios de escalamiento: un criterio de similitud geométrica verificado en la etapa anterior y un criterio de similitud relacionado con la dinámica del fluido asociado a un número adimensional (número de Reynolds  $[Re]$ ). En esta etapa se correlacionaron los procesos de fermentación de las cepas seleccionadas con un criterio de similitud fluidodinámica denominado *número de Reynolds*, frecuentemente usado para describir procesos de mezcla (Reynolds, 1883). Dicho criterio representa los mecanismos de transferencia de la cantidad de movimiento como una función simple de las fuerzas de inercia (la velocidad característica del fluido) y de las fuerzas viscosas (la viscosidad  $\mu$  del fluido). A partir

de esta premisa de semejanza dinámica, se determinó la velocidad de agitación que se debía mantener en el biorreactor a escala piloto con los datos obtenidos en la etapa 2 (tabla 15.5). En los resultados obtenidos se evidenció un aumento del 50 % en las velocidades de crecimiento de ambas cepas, en relación con los valores encontrados en la etapa anterior. A las 26 horas de fermentación se obtuvieron las concentraciones celulares máximas, semejantes a las obtenidas en las demás fermentaciones *fed-batch*, acercándose más a los valores encontrados a escala de laboratorio. En contraste, se presentaron diferencias significativas con respecto a las fermentaciones tipo *batch* para las producciones de la cepa AC1.

**Etapa 4.** Evaluación de una estrategia de cocultivo de las cepas AC1 y AC10. Con el objetivo de reducir los costos y tiempos de producción, simplificar el control de calidad del bioproducto y reducir el gasto energético de los equipos empleados para el proceso de fermentación líquida, se evaluó una estrategia de fermentación simultánea de las dos cepas, o tipo cocultivo (Bader et al., 2010). La producción del principio activo de *Monibac* líquido a escala piloto se realizó en un STR Biolab 50b bajo las condiciones estandarizadas en los procesos anteriores. La concentración final celular de este cocultivo fue de  $1,66 \times 10^{10}$  UFC mL<sup>-1</sup> y fue significativamente diferente a los demás resultados obtenidos en el desarrollo del biofertilizante. También se observó un aumento de la velocidad de crecimiento del 30 %, mientras que la productividad máxima y el rendimiento presentaron valores similares a los obtenidos en las fermentaciones a escala piloto convencionales.

**Etapa 5.** Evaluación del efecto de la relación carbono-nitrógeno en el medio de cultivo. Con el fin de mejorar los parámetros cinéticos y de productividad del proceso de fermentación tipo *fed-batch* de las cepas AC1 y AC10, se estudiaron diferentes relaciones de fuente de nitrógeno y fuente de carbono a escala de laboratorio en un biorreactor STR Infors, modelo Minifors, y el modo de implementación o aplicación de esta variación en el medio de cultivo. Se encontró que, empleando una relación N/C inicial de 1,00/5,25, aplicada en el medio de cultivo usado al inicio de la estrategia de alimentación, se aumentó la concentración celular en un 37,5 % con respecto a la obtenida en las fermentaciones tipo cocultivo, mientras que el parámetro de productividad se mantuvo igual

(tabla 15.5). Adicionalmente, el consumo de fuente de C aumentó, lo que se reflejó en un incremento del 100 % en el rendimiento biomasa-sustrato y en un aumento del 35 % en la velocidad de crecimiento.

En resumen, los resultados anteriores demostraron la reproducibilidad de las variables de respuesta evaluadas en las fermentaciones a escala de planta piloto con respecto a las obtenidas en la escala de laboratorio, así como el éxito de la estrategia de escalamiento planteada al aumentar la eficiencia global del proceso (tabla 15.7).



- **Tabla 15.7.** Comparación de los resultados obtenidos en el proceso de ajuste y escalamiento de la producción de *Rhizobium* sp. AC1 y *A. pusense* AC10 con respecto a la línea base. Nota: ND: No determinado. La dirección de la flecha indica aumento o disminución en la magnitud. Fuente: Elaboración propia

### 1 Escala de laboratorio

Volumen: 3,5 L / Estrategia: *batch*

Viabilidad celular ( $10^9$  UFC mL<sup>-1</sup>)

AC1: 1,71 ± 0,12 / AC10: 2,79 ± 0,79

Productividad máxima (log<sub>10</sub> [UFC mL<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup>]):

AC1: 0,355 ± 0,001 / AC10: 0,363 ± 0,005

Rendimiento biomasa-sustrato (g g<sup>-1</sup>): ND

Consumo de aire (L de aire L de cultivo<sup>-1</sup>): 22.285,71

Consumo energético (kW h<sup>-1</sup> L de cultivo<sup>-1</sup>): 0,69

### 2 Escala piloto

Volumen: 70 L / Estrategia: *cocultivo fed-batch*

Viabilidad celular ( $10^9$  UFC mL<sup>-1</sup>): 16,6 ± 9,80

Productividad máxima (log<sub>10</sub> [UFC mL<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup>]): 0,393 ± 0,001

Rendimiento biomasa-sustrato (g g<sup>-1</sup>): 0,47 ± 0,00

Consumo de aire (L de aire L de cultivo<sup>-1</sup>): 1.188,84

Consumo energético (kW h<sup>-1</sup> L de cultivo<sup>-1</sup>): 0,0016

### 3 Diferencia (porcentaje)

Viabilidad celular ( $10^9$  UFC mL<sup>-1</sup>): 8,2-10,7 ↑

Productividad máxima (log<sub>10</sub> [UFC mL<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup>]): 8,2-10,7 ↑

Rendimiento biomasa-sustrato (g g<sup>-1</sup>): ND

Consumo de aire (L de aire L de cultivo<sup>-1</sup>): 94,8 ↓

Consumo energético (kW h<sup>-1</sup> L de cultivo<sup>-1</sup>): 99,8 ↓

## Diseño de la formulación

La formulación de un biofertilizante se debe diseñar de forma específica con cada uno de los ingredientes activos usados, ya que se debe demostrar la compatibilidad de los excipientes o coadyuvantes con los microorganismos fijadores de nitrógeno, para que no se afecte negativamente su actividad biológica. Además, la selección de adyuvantes debe tener en cuenta no solamente la protección física del microorganismo, sino otros factores como la forma y frecuencia de aplicación, la temperatura de almacenamiento, el cultivo objetivo, entre otros, de manera que se asegure una aplicación eficiente del bioproducto.





## Compatibilidad del ingrediente activo con coadyuvantes

A partir del caldo de fermentación de las dos cepas bacterianas, se elaboraron mezclas con coadyuvantes, dentro de las cuales se encontraban agentes suspensores, estabilizantes, humectantes y solventes. Como tratamiento control, se empleó el caldo de fermentación sin adición de ningún coadyuvante, pero sometido a las mismas condiciones de mezcla que los demás tratamientos. En el tiempo cero y después de 15 días de almacenamiento a 4 y 25 °C, se evaluó la viabilidad celular en cada uno de los tratamientos realizados.

Los tratamientos almacenados durante 15 días a 4 °C presentaron una pérdida de viabilidad de entre el 4 % y el 16 %, en tanto que los tratamientos almacenados durante el mismo tiempo a 25 °C presentaron una pérdida de viabilidad de entre el 3 % y el 30 %. Estos resultados evidenciaron un efecto negativo de la temperatura sobre la viabilidad de las mezclas binarias microorganismo-coadyuvante. Además, ninguno de los tratamientos almacenados a las dos temperaturas presentó un efecto significativo con respecto al tratamiento control, lo que indica que ninguna de las sustancias evaluadas afecta la viabilidad de las dos cepas. Al analizar los resultados obtenidos, se seleccionaron los excipientes Ba03 y Ps05, que corresponden a un agente solvente y un humectante, en su orden. Los excipientes seleccionados actúan como reductores de actividad de agua y también forman parte de las sustancias conocidas como *solutos compatibles*, las cuales protegen la estructura y función celular de los microorganismos bajo condiciones de estrés (Brown, 1976).

## Selección de prototipos

Con base en los resultados anteriores, se elaboraron cuatro prototipos de formulación (T2-T5), los cuales se evaluaron en contraste con un tratamiento control (T1: caldo de fermentación de las dos cepas bacterianas sin coadyuvantes) (tabla 15.8). Cada formulación y su control se almacenaron a 35 °C durante un mes, y se evaluó la viabilidad celular en el tiempo cero y después de finalizar el tiempo de almacenamiento.

- **Tabla 15.8.** Tratamientos evaluados en la selección de prototipos de las cepas *Rhizobium* sp. AC1 y *A. pusense* AC10 bajo condiciones de laboratorio.

Fuente: Elaboración propia

- 
- |          |           |  |
|----------|-----------|--|
| <b>1</b> | <b>T1</b> | <b>Composición:</b> Caldo de fermentación                            |
| <b>2</b> | <b>T2</b> | <b>Composición:</b> Caldo de fermentación + Sp09 (0,15%)             |
| <b>3</b> | <b>T3</b> | <b>Composición:</b> Caldo de fermentación + Sp09 (0,15%) + Ba03 (1%) |
| <b>4</b> | <b>T4</b> | <b>Composición:</b> Caldo de fermentación + Ps05 (3%) + Ba03 (1%)    |
| <b>5</b> | <b>T5</b> | <b>Composición:</b> Caldo de fermentación + Sp09 (0,15%) + Ps05 (3%) |
-

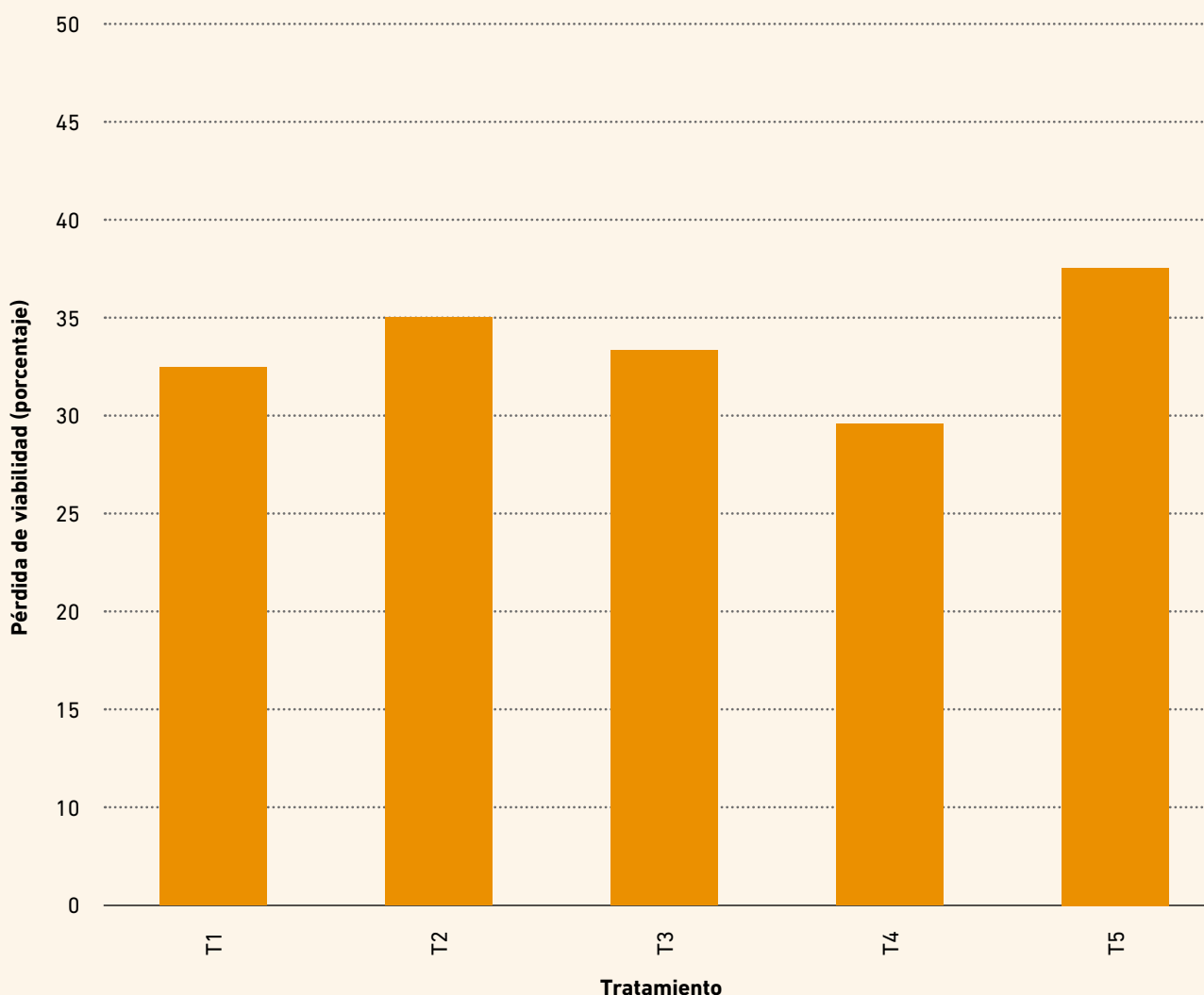
Después de 30 días de almacenamiento a una temperatura de  $35 \pm 2$  °C, el tratamiento T5 presentó una pérdida de viabilidad significativamente mayor que el tratamiento T1, que correspondió al caldo de fermentación sin formular, lo que indica que los componentes del prototipo T5 afectaron la viabilidad de los microorganismos (Figura 15.5). Por su parte, no se presentaron diferencias significativas en la pérdida de viabilidad de los tratamientos T1, T2 y T3, lo que indica que la composición de los tratamientos T2 y T3 no tuvo un efecto negativo sobre la viabilidad de las bacterias. El tratamiento T4, a su vez, presentó el menor valor de pérdida de viabilidad, un 29,15%, resultado significativamente inferior al del tratamiento T2 (34,42%),

pero no presentó diferencias significativas con respecto a los tratamientos T1 y T3. Después de 30 días de almacenamiento a 35 °C, se observó que los tratamientos T2, T3 y T5 tomaron una coloración negra y un fuerte olor a azufre, pero no así los prototipos T1 y T4. Dado que el excipiente Sp09 era el factor común en los tratamientos T2, T3 y T5, posiblemente el cambio de color y olor del producto se debió a que este excipiente tiene como parte de su estructura ésteres de sulfato, los cuales pueden ser hidrolizados a altas temperaturas (Rowe et al., 2009). Así, a partir de los resultados de viabilidad obtenidos, se seleccionó el tratamiento T4 para continuar con el estudio de vida útil propuesto.

■ **Figura 15.5.** Estabilidad de los prototipos de formulación almacenados a  $35 \pm 2$  °C.

Nota: Barras con la misma letra no presentan diferencias significativas según la prueba de Tukey a un nivel de confianza del 95%. La codificación de los tratamientos se presentó en la tabla 15.8.

Fuente: Elaboración propia



## Estudio de vida útil

A partir de los resultados del ensayo anterior, se seleccionó el prototipo más estable durante el almacenamiento a 35 °C (T4). El tratamiento T4 fue nuevamente almacenado a tres temperaturas:  $4 \pm 2$  °C,  $20 \pm 3$  °C y  $30 \pm 3$  °C, y se evaluó su viabilidad en el tiempo cero y después de 15, 30, 45 y 60 días de almacenamiento. Como tratamiento control, se almacenó el caldo sin formular. Además, se calculó la constante de degradación o pérdida de viabilidad mediante las ecuaciones 1a, 1b y 1c. Finalmente, mediante la ecuación de Arrhenius, se determinó la energía de activación y se predijo el tiempo de vida útil a las tres temperaturas evaluadas (ecuación 2).

### Ecuación de orden cero:

$$N = -k \cdot t + N_0 \quad (1a).$$

### Ecuación de orden uno:

$$\log \log N = \log \log N_0 - k \cdot t \quad (1b).$$

### Ecuación de orden dos:

$$\frac{1}{N} = k \cdot t + \frac{1}{N_0} \quad (1c);$$

$$k = A \cdot \left( \frac{-E_a}{R \cdot T} \right) \quad (2),$$

donde  $N$  es la viabilidad en el tiempo  $t$ ;  $K$  es la constante de degradación;  $N_0$  es la viabilidad celular inicial;  $A$  es el factor de frecuencia;  $E_a$  es la energía de activación (Kcal mol<sup>-1</sup>);  $R$  es la constante de los gases ideales (1,987 Kcal Kmol<sup>-1</sup>); y  $T$  es la temperatura en °C.

A partir de los resultados obtenidos, se observó que la mayoría de los tratamientos presentaron una mayor correlación y linealidad con los modelos cinéticos de orden uno, a excepción del tratamiento T4 almacenado a una temperatura de 4 °C y el tratamiento T1 (control) almacenado a una temperatura de 30 °C, los cuales presentaron un mayor valor de correlación  $R^2$  con una reacción de orden 2. Sin embargo, teniendo en cuenta que los tratamientos evaluados poseen el mismo ingrediente activo, de acuerdo con Osorio et al. (2013), se seleccionó el modelo cinético al que se ajustó la mayoría de los

tratamientos bajo las tres condiciones de almacenamiento, siendo este el modelo de orden uno, al cual se ajusta la mayoría de los productos a base de microorganismos en medio acuoso (Madigan et al., 2003); por tanto, con este modelo cinético se determinó la constante de degradación o pérdida de viabilidad. En general, la constante de degradación fue mayor cuando los tratamientos se almacenaron a la temperatura de 30 °C, en comparación con la temperatura a 20 °C, y en esta, a su vez, en comparación con la de 4 °C, lo que indica que, a mayor temperatura, la viabilidad de las bacterias disminuye.

Empleando los tratamientos T1 y T4, se determinó la energía de activación de cada uno (18,75 Kcal mL<sup>-1</sup> y 20,066 Kcal mol<sup>-1</sup>, respectivamente), lo que demostró una mayor estabilidad del tratamiento T4 con respecto al control. Posteriormente, se predijo el tiempo en que cada tratamiento a una temperatura dada alcanzaría una concentración teórica de  $1 \times 10^8$  UFC mL<sup>-1</sup>, ya que esta es la concentración mínima efectiva estandarizada para el bioproducto (tabla 15.9).



- **Tabla 15.9.** Tiempo de almacenamiento teórico de los prototipos de formulación para alcanzar una concentración de  $1 \times 10^8$  UFC mL<sup>-1</sup> a diferentes temperaturas.

Nota: La codificación de los tratamientos se presentó en la tabla 15.8.

Fuente: Elaboración propia

### 1 T1

4 °C

- **Tiempo de almacenamiento (días):** 320,08

20 °C

- **Tiempo de almacenamiento (días):** 35,01

30 °C

- **Tiempo de almacenamiento (días):** 9,95

### 2 T4

4 °C

- **Tiempo de almacenamiento (días):** 340,70

20 °C

- **Tiempo de almacenamiento (días):** 44,18

30 °C

- **Tiempo de almacenamiento (días):** 9,71

Los resultados obtenidos permitieron observar que para cada temperatura evaluada el tiempo de vida útil es similar, alcanzando sus valores máximos equivalentes a los 11 meses, aproximadamente, a una temperatura de almacenamiento de 4 °C. El efecto deletéreo del almacenamiento fue más drástico a medida que aumentó la temperatura, comportamiento que probablemente se

debe a que el metabolismo del microorganismo se puede encontrar más activo a temperaturas elevadas (Marino et al., 2004). Por el contrario, a menores temperaturas de refrigeración, el metabolismo celular disminuye, se previene la formación de metabolitos tóxicos y se evita el agotamiento de nutrientes, lo que extiende la vida del microorganismo en almacenamiento (Sabaratnam & Traquair, 2002).





# Referencias

- Bader, J., Mast-Gerlach, E., Popović, M. K., Bajpai, R., & Stahl, U. (2010). Relevance of microbial coculture fermentations in biotechnology. *Journal of Applied Microbiology*, *109*(2), 371-387. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2009.04659.x>
- Bashan, Y. (1998). Inoculants of plant growth-promoting bacteria for use in agriculture. *Biotechnology Advances*, *16*(4), 729-770. [https://doi.org/10.1016/S0734-9750\(98\)00003-2](https://doi.org/10.1016/S0734-9750(98)00003-2)
- Ben Rebah, F., Prévost, D., Yezza, A., & Tyagi, R. D. (2007). Agro-industrial waste materials and wastewater sludge for rhizobial inoculant production: A review. *Bioresource Technology*, *98*(18), 3.535-3.546. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2006.11.066>
- Ben Rebah, F., Tyagi, R. D., & Prévost, D. (2002). Wastewater sludge as a substrate for growth and carrier for rhizobia: The effect of storage conditions on survival of *Sinorhizobium meliloti*. *Bioresource Technology*, *83*(2), 145-151. [https://doi.org/10.1016/S0960-8524\(01\)00202-4](https://doi.org/10.1016/S0960-8524(01)00202-4)
- Bonilla Buitrago, R., & Morales, J. G. (2005). Monibac: un biofertilizante con base en cepas nativas de *Azobacter* sp. para incrementar la productividad y sostenibilidad del algodón. *Revista Innovación y Cambio Tecnológico*, *4*(3-4), 30-34. [https://repository.agrosavia.co/bitstream/handle/20.500.12324/15346/42804\\_46937.pdf?sequence=1&isAllowed=y](https://repository.agrosavia.co/bitstream/handle/20.500.12324/15346/42804_46937.pdf?sequence=1&isAllowed=y)
- Brockwell, J., Gault, R. R., Herridge, D. F., Morthorpe, L. J., & Roughley, R. J. (1988). Studies on alternative means of legume inoculation: Microbiological and agronomic appraisals of commercial procedures for inoculating soybeans with *Bradyrhizobium japonicum*. *Australian Journal of Agricultural Research*, *39*(6), 965-972. <https://doi.org/10.1071/AR9880965>
- Brown, A. D. (1976). Microbial water stress. *Bacteriological Reviews*, *40*(4), 803-846. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/1008746>
- Burton, J. C. (1981). *Rhizobium* inoculants for developing countries. *Tropical Agriculture*, *58*(4), 291-295. [https://pdf.usaid.gov/pdf\\_docs/pnaak123.pdf](https://pdf.usaid.gov/pdf_docs/pnaak123.pdf)
- Camelo-Rusínque, M., Moreno-Galván, A., Romero-Perdomo, F., & Bonilla-Buitrago, 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. <https://doi.org/10.1016/j.ram.2016.06.005>
- Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria (AGROSAVIA). (2017). *Balance social 2017*. [https://repository.agrosavia.co/bitstream/handle/20.500.12324/12011/110038\\_67755.pdf?sequence=1&isAllowed=y](https://repository.agrosavia.co/bitstream/handle/20.500.12324/12011/110038_67755.pdf?sequence=1&isAllowed=y)
- Daza, A., Santamaría, C., Rodríguez-Navarro, D. N., Camacho, M., Orive, R., & Temprano, F. (2000). Perlite as a carrier for bacterial inoculants. *Soil Biology and Biochemistry*, *32*(4), 567-572. [https://doi.org/10.1016/S0038-0717\(99\)00185-6](https://doi.org/10.1016/S0038-0717(99)00185-6)

- Denardin, N. D., & Freire, J. R. J. (2000). Assessment of polymers for the formulation of legume inoculants. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 16(3), 215-217. <https://doi.org/10.1023/A:1008914223467>
- Escobar, C., Horna, Y., Carreño, C., & Mendoza, G. (2011). Caracterización de cepas nativas de *Azotobacter* spp. y su efecto en el desarrollo de *Lycopersicon esculentum* Mill. "tomate" en Lambayeque. *Scientia Agropecuaria*, 2(1), 39-49. <https://doi.org/10.17268/sci.agropecu.2011.01.05>
- Hartley, E. J., Gemell, L. G., Slattery, J. F., Howieson, J. G., & Herridge, D. F. (2005). Age of peat-based lupin and chickpea inoculants in relation to quality and efficacy. *Australian Journal of Experimental Agriculture*, 45(3), 183-188. <https://doi.org/10.1071/ea03158>
- Lim, H. C., & Shin, H. S. (2013). *Fed-batch cultures: Principles and applications of semi-batch bioreactors*. Cambridge University Press.
- Madigan, M. T., Martinko, J. M., & Parker, J. (2003). *Brock. Biología de los microorganismos* (10.ª ed.). Prentice Hall.
- Marino, P., Villamizar, L., Espinel, C., & Cotes, A. (2004). Caracterización de prototipos de bioplaguicidas granulados a base de *Metarhizium anisopliae* para el control de *Ancognatha scarabaeoides* (Coleóptera: Melolonthidae). *Revista Colombiana de Entomología*, 30(1), 43-49.
- Menéndez, C., Trujillo, L. E., Ramírez, R., González-Peña, D., Espinosa, D., Enriquez, G. A., & Hernández, L. (2014). Producción de un inoculante líquido de *Bradyrhizobium japonicum* con alto impacto en la siembra mecanizada de la soya en Cuba. *Bioteología Aplicada*, 31(2), 111-115. <https://www.medigraphic.com/cgi-bin/new/resumen.cgi?IDARTICULO=51730>
- Moreno, A. E., Rojas, D. F., & Bonilla, R. R. (2011). Aplicación de diseños estadísticos secuenciales en la identificación de fuentes nutricionales para *Azotobacter chroococcum* AC1. *Ciencia & Tecnología Agropecuaria*, 12(2), 151-158. [https://doi.org/10.21930/rcta.vol12\\_num2\\_art:226](https://doi.org/10.21930/rcta.vol12_num2_art:226)
- Munévar, F. (1989). Aumento en la rentabilidad del cultivo de la soya y otras leguminosas mediante el uso de inoculantes [ICA, documento interno 102].
- Osorio, O., Villareal, Y., Mejía, D. F., & Cerón, A. F. (2013). Efecto de pasteurización sobre características sensoriales y contenido de vitamina C en jugos de frutas. *Bioteología en el Sector Agropecuario y Agroindustrial*, 11(2), 66-75. <https://revistas.unicauca.edu.co/index.php/bioteologia/article/view/302>
- Paredes, M. C. (2013). *Fijación biológica de nitrógeno en leguminosas y gramíneas* [tesis de grado, Pontificia Universidad Católica Argentina]. <https://repositorio.uca.edu.ar/handle/123456789/393>
- Qu, L., Ren, L.-J., Sun, G.-N., Ji, X.-J., Nie, Z.-K., & Huang, H. (2013). Batch, fed-batch and repeated fed-batch fermentation processes of the marine thraustochytrid *Schizochytrium* sp. for producing docosahexaenoic acid. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 36(12), 1.905-1.912. <https://doi.org/10.1007/s00449-013-0966-7>
- Reynolds, O. (1883). xxix. An experimental investigation of the circumstances which determine whether the motion of water shall be direct or sinuous, and of the law of resistance in parallel channels. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London*, 174. <https://doi.org/10.1098/rstl.1883.0029>
- Rivera, D., Camelo, M., Estrada, G., Obando, M., & Bonilla, R. (2010). Efecto de diferentes plaguicidas sobre el crecimiento de *Azotobacter chroococcum*. *Revista Colombiana de Biotecnología*, 12(1), 94-102. <https://revistas.unal.edu.co/index.php/bioteologia/article/view/15566/16323>
- Roughley, R. J. (1970). The preparation and use of legume seed inoculants. *Plant and Soil*, 32, 675-701. <https://doi.org/10.1007/BF01372900>
- Rowe, R. C., Sheskey, P. L., & Quinn, M. E. (2009). *Handbook of pharmaceutical excipients* (6.ª ed.). Pharmaceutical Press. [https://jums.ac.ir/dorsapax/Data/sub\\_7/file/Handbook%20of%20pharmaceutical%20excipients.pdf](https://jums.ac.ir/dorsapax/Data/sub_7/file/Handbook%20of%20pharmaceutical%20excipients.pdf)
- Sabaratnam, S., & Traquair, J. A. (2002). Formulation of a *Streptomyces* biocontrol agent for the suppression of *Rhizoctonia* damping-off in tomato transplants. *Biological Control*, 23(3), 245-253. <https://doi.org/10.1006/bcon.2001.1014>
- Shay, L. K., Hunt, H. R., & Wegner, G. H. (1987). High-productivity fermentation process for cultivating industrial microorganisms. *Journal of Industrial Microbiology*, 2(2), 79-85. <https://doi.org/10.1007/BF01569506>
- Smith, R. S. (1992). Legume inoculant formulation and application. *Canadian Journal of Microbiology*, 38(6), 485-492. <https://doi.org/10.1139/m92-080>
- Smith, R. S. (1995). Inoculant formulations and applications to meet changing needs. En I. A. Tikhonovich, N. A. Provorov, V. I. Romanov, & W. E. Newton (eds.), *Nitrogen fixation: Fundamentals and applications* (pp. 653-657). Springer.
- Stephens, J. H. G., & Rask, H. M. (2000). Inoculant production and formulation. *Field Crops Research*, 65(2-3), 249-258. [https://doi.org/10.1016/S0378-4290\(99\)00090-8](https://doi.org/10.1016/S0378-4290(99)00090-8)

