

6

Producción de biofertilizantes

Andrés Díaz García¹
Martha Isabel Gómez Álvarez¹
Ginna Milena Quiroga Cubides¹
Erika Paola Grijalba Bernal¹
Mauricio Camelo Rusinque²
Ruth Rebeca Bonilla Buitrago²

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





Biofertilizante®



Introducción

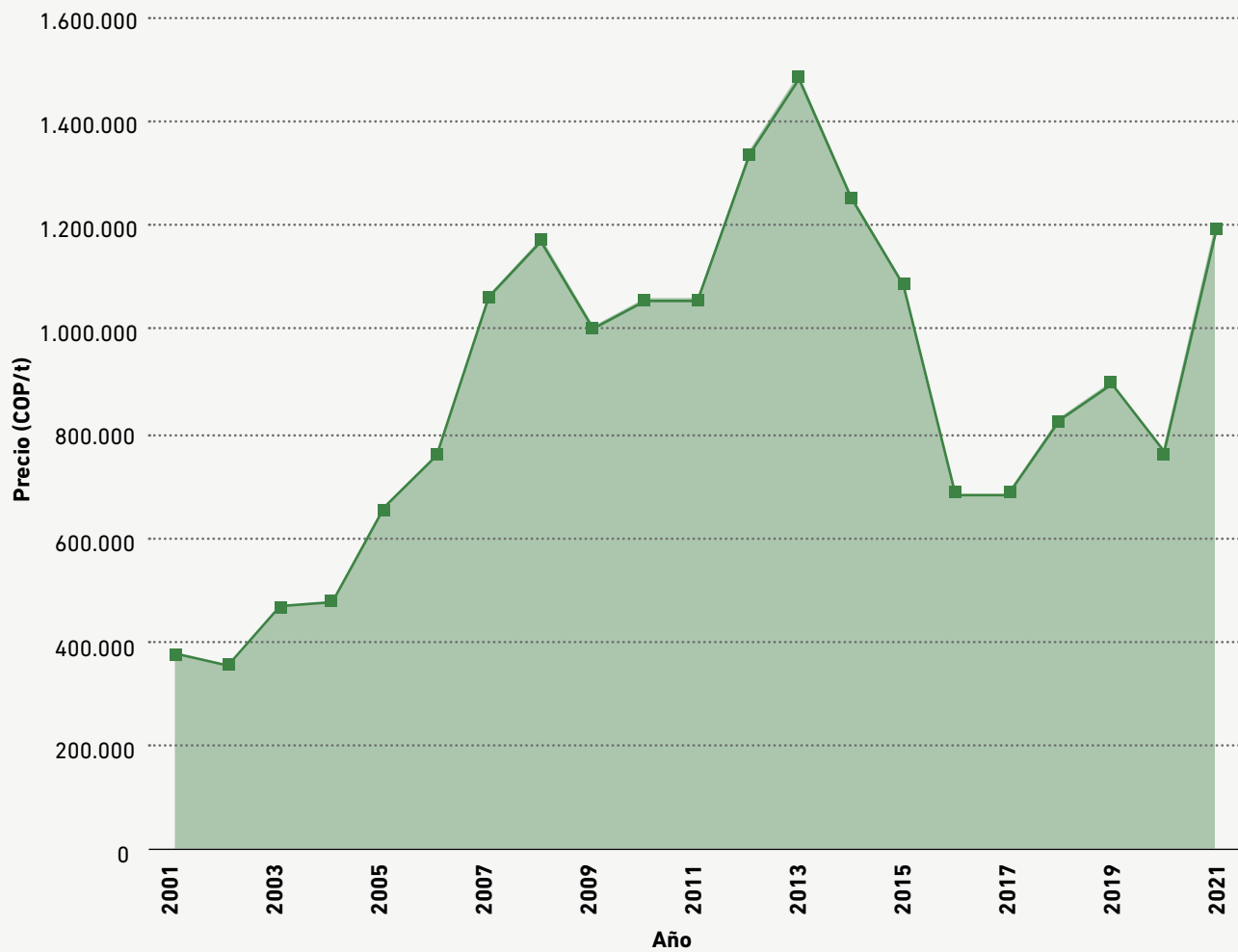
Es ampliamente conocida la importancia del nitrógeno en el crecimiento y desarrollo de las especies vegetales, pues lo necesitan en cantidades relativamente grandes (75-150 kg de N ha⁻¹); sin embargo, su disponibilidad en el suelo es baja debido a las condiciones de este y al clima, por lo cual, en la mayoría de los casos, se requiere adicionar fertilizantes nitrogenados para obtener una alta productividad en los sistemas de producción agropecuarios. Adicionalmente, el alto precio de los fertilizantes de síntesis química y sus efectos sobre el ambiente han hecho que se planteen alternativas más sostenibles para suministrar el nitrógeno que requieren los cultivos. En la Figura 6.1, por ejemplo, se presenta un promedio histórico del precio de la urea en los últimos 20 años, y se puede observar que, en los últimos 10 años, el precio se ha incrementado en un 50%. Según la base de datos del Departamento de Agricultura de los Estados Unidos, desde 2016 el precio ha venido aumentando año a año en un promedio del 25%, y en Colombia este precio es superior en un 30 o 40% (Jensen et al., 2012).

El nitrógeno se encuentra principalmente en la atmósfera en forma de N₂, y es necesario emplear el proceso Haber-Bosch para romper el triple enlace que une a las dos moléculas de nitrógeno, lo cual requiere de altas temperaturas y presiones y conlleva un alto impacto ambiental negativo por el uso de combustibles fósiles. Una alternativa para suplir las necesidades de este importante nutriente es su fijación biológica, fenómeno que permite la transformación del nitrógeno elemental del aire (N₂) en formas asimilables por las plantas. El proceso de fijación biológica de nitrógeno es llevado a cabo por una gama relativamente amplia de microorganismos procarióticos, entre los cuales se encuentran géneros como *Rhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Azotobacter*, *Azospirillum* y *Herbaspirillum* (Laranjo et al., 2014; Thilakarathna & Raizada, 2017).

Debido al alto costo de los fertilizantes nitrogenados en Colombia y a la marcada dependencia que tienen los cultivos de este nutriente, se hace necesario masificar la utilización de los biofertilizantes. Desde hace varias décadas, el Instituto Colombiano Agropecuario (ICA) y la Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria (AGROSAVIA) han trabajado en los procesos de evaluación, selección, producción masiva, formulación y escalamiento de cepas fijadoras de nitrógeno para diferentes cultivos como sustituto de los fertilizantes nitrogenados.

■ **Figura 6.1.** Precio de la urea, 2001-2021.

Fuente: www.indexmundi.com





Desarrollo de medios de cultivo, formulaciones y control de calidad de biofertilizantes

En el desarrollo tecnológico de un biofertilizante se deben surtir varias etapas relacionadas principalmente con la estandarización de la producción masiva del microorganismo, mediante procesos de fermentación, para asegurar cantidades adecuadas de biomasa microbiana para los procesos de formulación y control

de calidad del bioproducto terminado. La idoneidad y experticia del equipo involucrado en todas las etapas del desarrollo tecnológico permitirá asegurar la obtención de un biofertilizante eficiente, seguro, estable en almacenamiento y con resultados reproducibles en el tiempo cuando se aplica en campo.

Procesos de fermentación

En general, el tipo de fermentación más usado para la producción masiva de biomasa de microorganismos biofertilizantes es la fermentación líquida, ya que este sistema es altamente homogéneo y facilita un control riguroso de las variables críticas del proceso, como la agitación, la concentración de oxígeno disuelto y la temperatura. El fermentador tipo reactor de tanque agitado convencional (STR, por sus siglas en inglés), con turbinas Rushton, es la elección más utilizada, ya que genera unos patrones de flujo y de mezcla radiales bien definidos, que favorecen la obtención de altos valores del coeficiente volumétrico de transferencia de masa ($k_L a$). Además, la mayoría de los microorganismos biofertilizantes toleran los esfuerzos cortantes generados dentro de esta clase de sistemas, sin que se afecte su viabilidad o velocidad específica de crecimiento.

Desarrollo de medios de cultivo y estandarización a escala de laboratorio

A nivel de laboratorio, para el crecimiento de los microorganismos que sirven como principio activo de los biofertilizantes, es usual trabajar con medios de cultivo bien definidos (*yeast extract mannitol*, Ashby, Okon, Pikovskaya, etc.), que brindan rendimientos de biomasa adecuados para llevar a cabo bioensayos *in vitro* y otros experimentos pequeños que no requieren más de un litro de caldo de fermentación. Sin embargo, cuando el objetivo es escalar los procesos a nivel piloto o industrial, el diseño y estandarización de un medio de cultivo específico para cada microorganismo toma relevancia, ya que criterios como la economía,

la eficiencia en la producción del ingrediente activo, la disponibilidad en cantidades significativas (kilogramos o toneladas) durante todo el año, la compatibilidad con el ingrediente activo y la pureza, entre otros, deben tenerse en cuenta para la selección de las materias primas de los medios de cultivo.

En esta etapa se aplican diseños estadísticos de tipo exploratorio (como Plackett-Burman, factoriales fraccionados, entre otros) con el fin de seleccionar, a escala de laboratorio, los componentes del medio que tienen un efecto significativo sobre la variable de respuesta, así como para definir los rangos de concentración promisorios, que deben ser optimizados en etapas posteriores.

Optimización del medio de cultivo

En la fase de optimización, el investigador debe manejar y gestionar *software* especializado en diseño de experimentos u otras herramientas estadísticas de análisis que le permitan llevar a cabo la implementación experimental a escala de laboratorio con un uso eficiente de los recursos (tiempo, equipos, personal). El desarrollo exitoso de este tipo de estrategias experimentales asegura la obtención de un medio de cultivo óptimo en función de las variables de respuestas de interés, tanto cualitativas como cuantitativas, asociadas al microorganismo biofertilizante en cuestión. Por ejemplo, para la optimización del medio de cultivo de un biofertilizante a base de *Azotobacter chroococcum*, se aplicó un diseño Box-Behnken en el que se evaluaron tres factores nutricionales en tres niveles y se generó un modelo polinomial de segundo orden para maximizar la producción de biomasa viable; este modelo explicó el 90,06 % de la variabilidad presentada durante la experimentación, y con los valores óptimos de los tres factores nutricionales se predijo un valor óptimo de $6,1 \times 10^9$ uFc mL⁻¹ de *A. chroococcum* (Moreno et al., 2011).

Cambio de escala del medio de cultivo

Antes de que la aplicación de un biofertilizante sea factible en áreas de cultivo amplias, debe surtir un proceso de cambio de escala —“escalamiento hacia arriba”— que asegure que el comportamiento del microorganismo dentro del sistema de fermentación es similar independientemente de la escala aplicada, con el fin de asegurar que los rendimientos obtenidos en el laboratorio se puedan reproducir en escalas superiores (piloto o industrial), y obtener así las cantidades necesarias para este tipo de aplicaciones.

Generalmente, en función de la facilidad y economía del proceso, se genera una estrategia de cambio de escala a nivel de laboratorio (~10 litros), cuya reproducibilidad se valida posteriormente a escala piloto (100–200 litros) o directamente a escala industrial (> 500 litros). La estrategia de cambio de escala debe tener en consideración dos grandes componentes: aspectos técnicos y aspectos de ingeniería del proceso de fermentación, los cuales deben ser tenidos en cuenta de manera simultánea durante todo el trabajo experimental.

Aspectos técnicos del proceso de fermentación: En esta categoría se debe analizar el efecto de componentes y procesos que pueden tener un efecto significativo sobre la variable de respuesta a escala industrial, tales como grado de pureza y manejo de materias primas, desarrollo de inóculos, esterilización de materiales y equipos, implementación de sistemas CIP (*cleaning in place*), entre otros (Ali et al., 2018; Crater & Lievense, 2018).

Aspectos de ingeniería: En esta categoría se analiza el efecto de las variables críticas que se han identificado, para conocer si afectan significativamente el proceso de fermentación, así como de las variables de respuesta definidas. Estas variables críticas se denominan *criterios de escalamiento* y se analizan en profundidad mediante experimentos cuidadosamente planificados para generar modelos predictivos o correlaciones empíricas de cambio de escala que permitan hacer un análisis detallado del fenómeno en escala de laboratorio y su posterior validación a escala piloto.

Las herramientas más usadas para generar estrategias de escalado son:



Diseño de experimentos clásico mediante la aplicación de técnicas de optimización.



Uso de números adimensionales.



Correlaciones empíricas.

Para la aplicación de la estrategia seleccionada, es esencial usar, en primera instancia, un criterio de similitud geométrica entre los fermentadores usados en las dos escalas y aplicar uno o más criterios adicionales que se relacionan con la transferencia de masa y de calor, la hidrodinámica o la fisicoquímica de los procesos aerobios; entre estos criterios se encuentran los siguientes (Crater & Lievense, 2018):



Potencia por unidad de volumen (P/V).



Tiempo de mezcla (t_m).



Coefficiente volumétrico de transferencia de masa gas-líquido ($k_L a$).



Velocidad de punta del impulsor (nD).



Retención de gas (ϵ).



Presión hidrostática en el líquido (P_l).

En la tabla 6.1 se presentan algunos ejemplos de escalado hacia arriba aplicados para la producción de microorganismos biofertilizantes.



■ **Tabla 6.1.** Ejemplos de microorganismos con capacidad biofertilizante escalados

1 **Microorganismo evaluado:** *Azospirillum* sp., cepa 8-Inica

Criterios de escalamiento aplicados*: Número de aireación

($N_a = Q/n \cdot D_i^3$); número de Reynolds ($Re = n \cdot D_i^2 \cdot \rho / \mu$), y número de potencia

($N_p = P_g / r \cdot n^3 \cdot D_i^5$)

Volumen final: 5.000 L

Referencia: San Juan et al. (2013)

2 **Microorganismo evaluado:** *Rhizobium* sp. AC1 y *Agrobacterium pusense* AC10

Criterios de escalamiento aplicados*: Número de Reynolds

($Re = n \cdot D_i^2 \cdot \rho / \mu$)

Volumen final: 100 L

Referencia: Quiroga-Cubides et al. (2017)

* Además del criterio de similitud geométrica entre los biorreactores de las dos escalas.

Nota: Q: flujo volumétrico de aire (L min⁻¹); n: velocidad del impulsor (rpm); D_i: diámetro del impulsor (m); ρ: densidad del líquido (kg m³); μ: viscosidad del líquido (kg m·s⁻¹); P_g: potencia gaseada (kg m·s⁻¹).

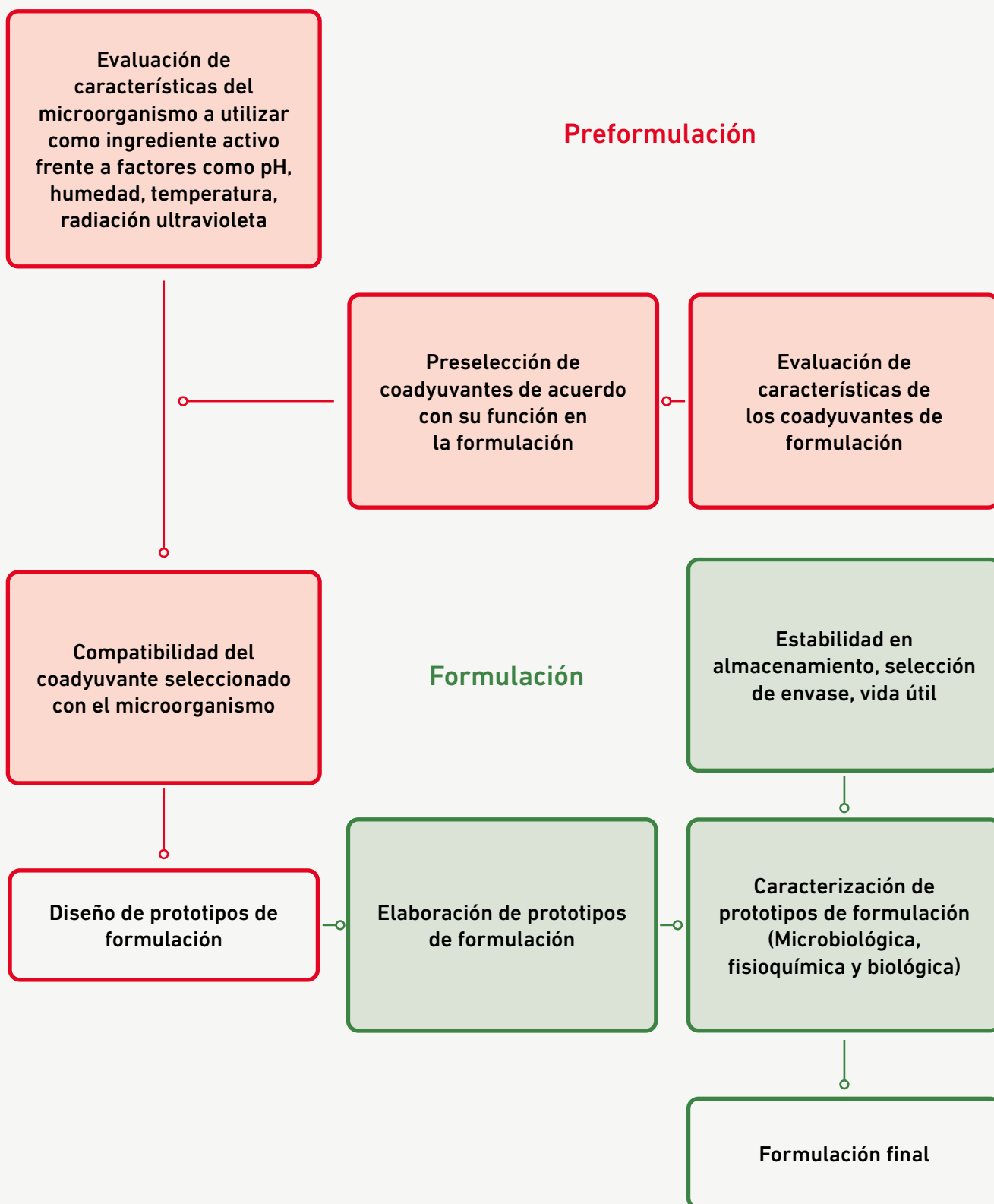


Formulación de los biofertilizantes

Los biofertilizantes se definen como inóculos fúngicos o bacterianos que, al ser aplicados a las plantas, permiten incrementar la disponibilidad de los nutrientes y su utilización por parte de estas.

Los biofertilizantes pueden también definirse como bioestimulantes microbianos que mejoran la eficiencia en la nutrición de las plantas (Du Jardin, 2015). En la formulación, el ingrediente activo ejerce la actividad biológica, que es, en este caso, hacer disponibles elementos nutricionalmente importantes para las plantas que no se encuentran disponibles para su asimilación, a través de procesos biológicos (Vessey, 2003). En general, la formulación ideal debe cumplir con los siguientes criterios: 1) estabilizar al microorganismo y extender su vida útil; 2) proteger al ingrediente activo de factores ambientales externos en el sitio blanco de acción, y 3) facilitar la aplicación del biofertilizante en condiciones de campo (Burges, 2012; Hermann et al., 2015). Sin embargo, en muchos países, los biofertilizantes desarrollados y comercializados no cumplen con parámetros de calidad, lo que causa inconsistencia en los resultados de su actividad biológica en campo, y esto produce una baja adopción a nivel comercial (Herrmann & Lesueur, 2013; Yadav & Chandra, 2014). Esta situación resalta la importancia de seguir un proceso de desarrollo riguroso tanto en la etapa de producción del microorganismo como en la etapa de diseño y desarrollo de la formulación, controlando todas las operaciones realizadas y llevando a cabo los controles de calidad pertinentes en cada una de ellas. En la Figura 6.2 se resumen algunas de las actividades que forman parte de la etapa de diseño y desarrollo de una formulación.

- **Figura 6.2.** Etapas requeridas en el proceso de diseño y desarrollo de una formulación para un biofertilizante.
Fuente: Elaboración propia



Diversas formulaciones de biofertilizantes han sido desarrolladas a nivel mundial (Tabassum et al., 2017), y en la actualidad el reto es que estos productos mantengan una alta viabilidad durante el almacenamiento (uno o dos años a temperatura ambiente) y en el sitio de aplicación (Lobo et al., 2019). En general, las formulaciones a base de microorganismos con potencial biofertilizante son líquidas o sólidas (Oliveira et al., 2017), con una concentración entre 1×10^7 y 1×10^9 UFC mL⁻¹ o g⁻¹ (Malusá & Vassilev, 2014). Otro enfoque considera el número de células viables por semilla después de la aplicación, el cual se encuentra en el orden de entre 1×10^3 y 1×10^5 , de acuerdo con el tamaño de la semilla (Bashan et al., 2014; Bharti et al., 2017). Las formulaciones líquidas corresponden al medio de fermentación completo o a la suspensión del microorganismo mezclado con agua, aceite o sustancias poliméricas y surfactantes, para incrementar su adherencia, estabilidad y capacidad de dispersión (Lee et al., 2016), mientras que en las formulaciones sólidas se emplean soportes inorgánicos u orgánicos, para obtener granulados o polvos (Adholeya & Das, 2012; Malusá et al., 2012). Comúnmente, en el mercado, la mayoría de los biofertilizantes se encuentran formulados como líquidos, ya que su proceso de elaboración es más sencillo y tienen un menor costo en comparación con las formulaciones sólidas (Kumaresan & Reetha, 2011).

En Colombia, a diciembre de 2018, de acuerdo con el ICA (2018), se encontraban registradas como inoculantes biológicos aproximadamente 75 formulaciones, a base de microorganismos solos o en mezcla, de los géneros *Bacillus*, *Azotobacter*, *Rhizobium*, *Pseudomonas*, *Saccharomyces*, *Bradyrhizobium*, *Acetobacter*, *Geotrichum*, *Azospirillum*, *Lactobacillus*, *Trichoderma*, *Rhodopseudomonas*, *Glomus*, *Acaulospora*, *Gigaspora*, *Penicillium* y *Scutellospora*. De estos inoculantes, el 61,33% correspondió a formulaciones líquidas (concentrados solubles, suspensiones concentradas y suspensiones líquidas), y el 38,66%, a formulaciones sólidas (sustratos sólidos, polvos y granulados dispersables). Aunque la mayoría de los biofertilizantes registrados a nivel mundial corresponden a formulaciones líquidas o sólidas (povos y granulados), se evidencia que hay nuevas tendencias en la investigación y el desarrollo de este tipo de productos que buscan sustituirlas en un futuro por medio de la obtención de formulaciones innovadoras, como, por ejemplo, matrices de liberación controlada o hidrogeles a base de polímeros o materiales poliméricos (Da Silva et al., 2012). En estas nuevas formulaciones, los microorganismos son inmovilizados en matrices, por lo que presentan mayor



viabilidad en condiciones de almacenamiento, en el suelo o en el sitio blanco de acción sobre la planta (Marcelino et al., 2016; Schoebitz et al., 2013). En 2016, Marcelino y colaboradores desarrollaron una espuma biodegradable a base de *Azospirillum brasilense* con el objetivo de que se formara una biopelícula en el momento de su aplicación. Uno de los prototipos que ellos desarrollaron fue estable durante cuatro meses de almacenamiento a temperatura ambiente y aun diez días después de su aplicación en el suelo, lo que sugiere que este tipo de formulación protegió y aportó nutricionalmente al microorganismo, permitiéndole mantenerse activo, en comparación con biofertilizantes líquidos a base de *A. brasilense*. Asimismo, Perez et al. (2018) desarrollaron macrocápsulas de almidón y quitosán a base de *A. brasilense* y *Pseudomonas fluorescens*; esta matriz polimérica fue estable durante doce meses de almacenamiento a temperatura ambiente, conservando la viabilidad de las bacterias en 1×10^9 UFC g⁻¹ y 1×10^8 UFC g⁻¹, respectivamente.

Control de calidad de los biofertilizantes

El aseguramiento de la calidad es uno de los principales factores en el proceso de producción y comercialización de biofertilizantes, pues permite asegurar la eficacia del producto a los consumidores finales (Benintende, 2010; Herrmann & Lesueur, 2013; Lupwayi et al., 2000; Vessey, 2003; Young, 2007).

Asegurar los estándares de calidad exigidos para el producto y mantener controlados los puntos críticos de la producción deben ser los principales objetivos a la hora de elaborar un bioproducto (Herrmann & Lesueur, 2013; Lupwayi et al., 2000; Sun et al., 2006). Para asegurar la calidad del producto y detectar a tiempo inconsistencias durante la producción, se le deben realizar controles de calidad al banco de trabajo o la cepa madre durante su almacenamiento, en el proceso de selección de coadyuvantes de formulación y durante la elaboración del producto final (Deaker et al., 2011; Lupwayi et al., 2000; Sethi & Adhikary, 2012).

El control de calidad que se realiza al banco de trabajo o la cepa madre consiste en la determinación de su viabilidad celular y su pureza (Herrmann & Lesueur, 2013; Lupwayi et al., 2000; Sun et al., 2006). En general, se espera que la cepa (o cepas) seleccionada como principio activo del bioproducto tenga la habilidad de ser cultivable y que sea genéticamente estable (Herridge et al., 2002). Durante la producción del principio activo (caldo de cultivo), se efectúa el conteo de células totales y se determina la viabilidad celular, la pureza y algunas características físicas y químicas vinculadas con la producción de metabolitos de interés (pH, concentración de biopolímeros, enzimas, etc.) o la presencia de contaminantes. Finalmente, al producto terminado, independientemente de la matriz en la que se encuentre, se le determina el número de células viables, la pureza y las propiedades fisicoquímicas que aseguran la estabilidad de la formulación, y también se realizan pruebas biológicas o bioquímicas para verificar la actividad biofertilizante del producto (Herrmann & Lesueur, 2013; Lupwayi et al., 2000; Sun et al., 2006).

Entre las técnicas más empleadas para la cuantificación celular directa, se encuentra el conteo en cámaras Thoma, Petroff-Hausser o Neubauer; en el conteo indirecto se emplea la densidad óptica y la turbidez (Lupwayi et al., 2000; Sun et al., 2006; Thompson, 1984). Asimismo, se utilizan técnicas inmunológicas y de cuantificación por *real time-PCR* (*real time-polymerase chain reaction*) (Deaker et al., 2011; Herrmann et al., 2015; Herrmann & Lesueur, 2013; Lupwayi et al., 2000; Thompson, 1984). En el caso de la viabilidad celular, se ha desarrollado una amplia gama de métodos, siendo los más empleados 1) el recuento en placa de Petri con medios selectivos, utilizando las técnicas de siembra por extensión, microgota (Miles et al., 1938) o vertido en placa, y 2) la fermentación en múltiples tubos, como el método del número más probable (Deaker et al., 2011; Herrmann et al., 2015; Lupwayi et al., 2000). Actualmente, se ha aumentado el uso de técnicas inmunológicas asociadas a cultivos en medios selectivos (Deaker et al., 2011; Herrmann et al., 2015; Lupwayi et al., 2000).

La pureza del principio activo, del caldo de cultivo o del producto terminado es un parámetro de control de calidad importante debido a que los microorganismos contaminantes compiten por espacio y nutrientes y pueden llegar a producir compuestos tóxicos como mecanismo de defensa (Herrmann & Lesueur, 2013). Los procedimientos más empleados para la determinación de contaminantes son la tinción de Gram (pared celular) (Deaker et al., 2011; Sun et al., 2006; Thompson, 1984) y el recuento en placa con medios como agar nutritivo (AN) y agar glucosa peptona, para el conteo de cepas bacterianas; PDA (*potato dextrose agar*) y agar Rosa de Bengala, para cepas fúngicas, y YM (*yeast mold*), para levaduriformes (Lupwayi et al., 2000; Thompson, 1984).

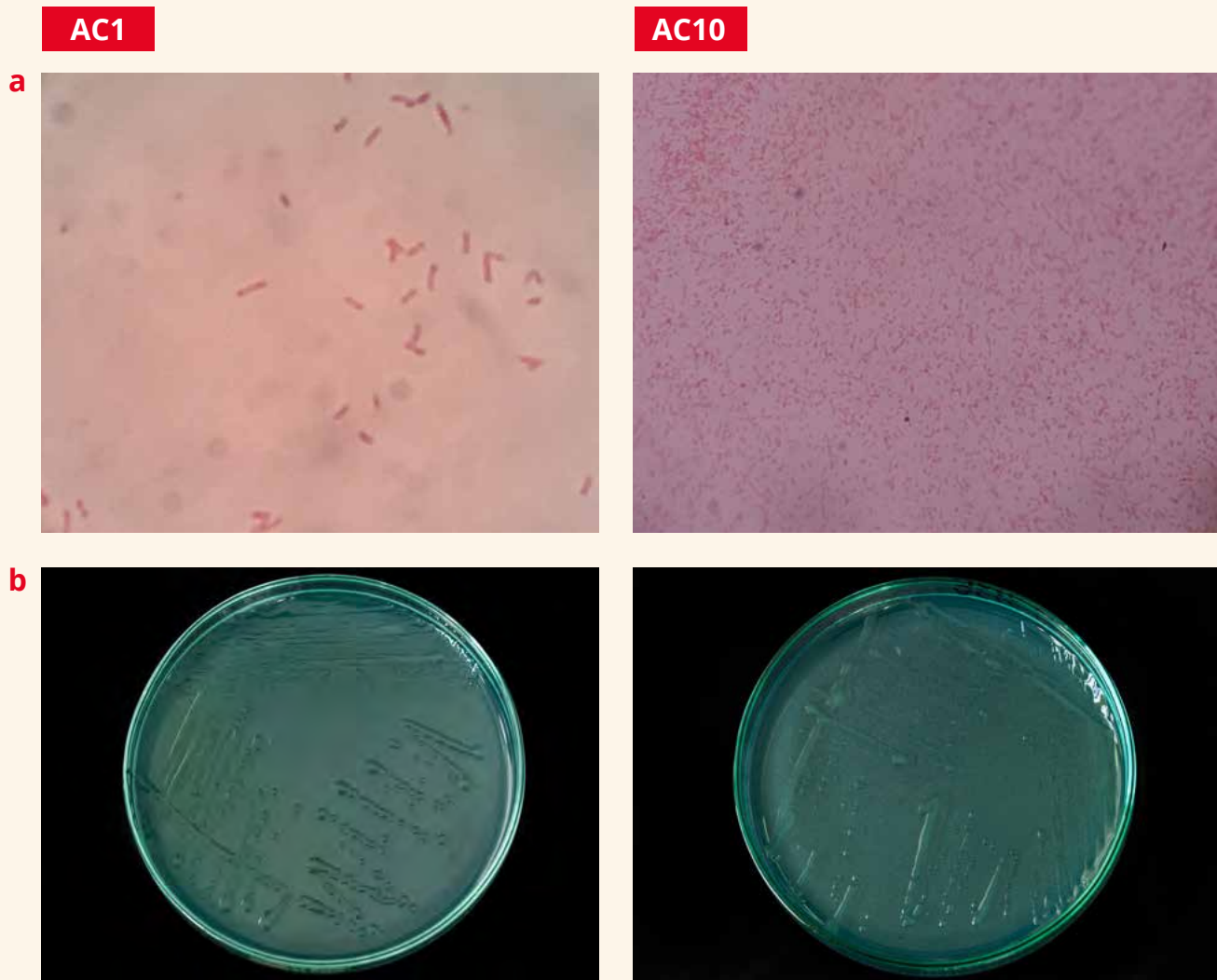
Durante la producción del principio activo y en el producto terminado, es frecuente que se evalúen variables fisicoquímicas como pH, viscosidad, contenido de humedad y tamaño de partícula. En algunos casos, el pH suele ser un indicador de presencia de contaminantes y, por lo tanto, se emplea como parámetro crítico en los procesos de fermentación (Herrmann & Lesueur, 2013; Sun et al., 2006; Thompson, 1984). El contenido de humedad, por su parte, es un parámetro que permite controlar la actividad de agua del producto terminado, y de este modo se previene la aparición de contaminantes (Sun et al., 2006).

La evaluación de la actividad biológica corresponde a uno de los parámetros de calidad más importantes dentro de la producción de inoculantes microbianos, ya que gracias a esta se definen la eficacia del bioinsumo y la estabilidad de la actividad biológica del principio activo (Herridge et al., 2002; Herrmann & Lesueur, 2013; Ohyama & Pham, 2006). En general, la evaluación de este parámetro se puede realizar por medio de ensayos en campo, estimando el rendimiento de la producción del cultivo vegetal, la medición del crecimiento vegetal y la absorción de nutrientes en los cultivos (Kennedy, 2008; Ohyama & Pham, 2006). Por otro lado, en el caso de los bioproductos que actúan como fijadores de nitrógeno, se han venido empleando métodos analíticos, entre los que se encuentran la actividad de reducción de acetileno (Eckert et al., 2001; Valero, 2003), la actividad fijadora de $^{15}\text{N}_2$ (Ohyama & Pham, 2006; Vose et

al., 1982), la prueba de producción de H_2 (Witty & Minchin, 1998) y el método de concentración relativa de nitrógeno ureico (Herridge & Peoples, 1990; Kushizaki et al., 1964). Asimismo, la estimación de la actividad de solubilización de fosfato se ha medido por métodos cualitativos con siembra en medios selectivos, encontrando degradación de fosfatos insolubles por cambios de pH (Becerra et al., 2011; Ohyama & Pham, 2006). La cuantificación de esta actividad se ha determinado por medio de la liberación de ácidos orgánicos producidos durante la solubilización del fósforo (Rodríguez & Fraga, 1999; Sharma et al., 2013), la formación de cromóforos (Icontec, 2018; Ohyama & Pham, 2006), o mediante el análisis de la actividad fosfatasa a partir de la reacción con *p*-nitrofenil fosfato (Otalora et al., 2003). Para los microorganismos promotores de crecimiento, se realiza la cuantificación de indoles totales y ácido indolacético (Icontec, 2018; Ohyama & Pham, 2006). En el caso de los productos a base de *Rhizobium*, su actividad biológica es medida como su capacidad de formación de nódulos en el tallo de la planta hospedera, método indirecto que permite la cuantificación de los microorganismos capaces de crecer en la planta (Ohyama & Pham, 2006; Yadav & Chandra, 2014).

Como ejemplo de lo anterior, en AGROSAVIA, para mantener la calidad del biofertilizante comercial Monibac líquido, los controles de calidad se efectúan en la colección del banco de trabajo, en el proceso de producción del principio activo y sobre el producto terminado. Las pruebas efectuadas en el banco de trabajo consisten en identificar micro y macroscópicamente las cepas de *Rhizobium* sp. AC1 y *Agrobacterium pusense* AC10. La primera caracterización se realiza por medio de la tinción de Gram, y la morfología de estas bacterias corresponde a cocobacilos Gram-negativos, de aproximadamente 2 μm (Figura 6.3a). Para la identificación macroscópica, se emplea el medio LG (*N-free sucrose medium*) (Turner & Gibson, 1980), selectivo para bacterias diazótroficas. Sus colonias son redondas, brillantes, convexas, lisas y ligeramente viscosas (Figura 6.3b). Además, se utiliza el recuento en placa para la cuantificación de contaminantes, empleando el medio AN, para el conteo de bacterias, y agar Rosa de Bengala, para cuantificar contaminantes fúngicos y levaduriformes.

- **Figura 6.3.** Control de calidad de *Rhizobium* sp. AC1 y *Agrobacterium pusense* AC10. *a.* Identificación microscópica; *b.* Recuento en placa (microgota) en medio LG.
Fuente: Laboratorio de Microbiología de Suelos de AGROSAVIA

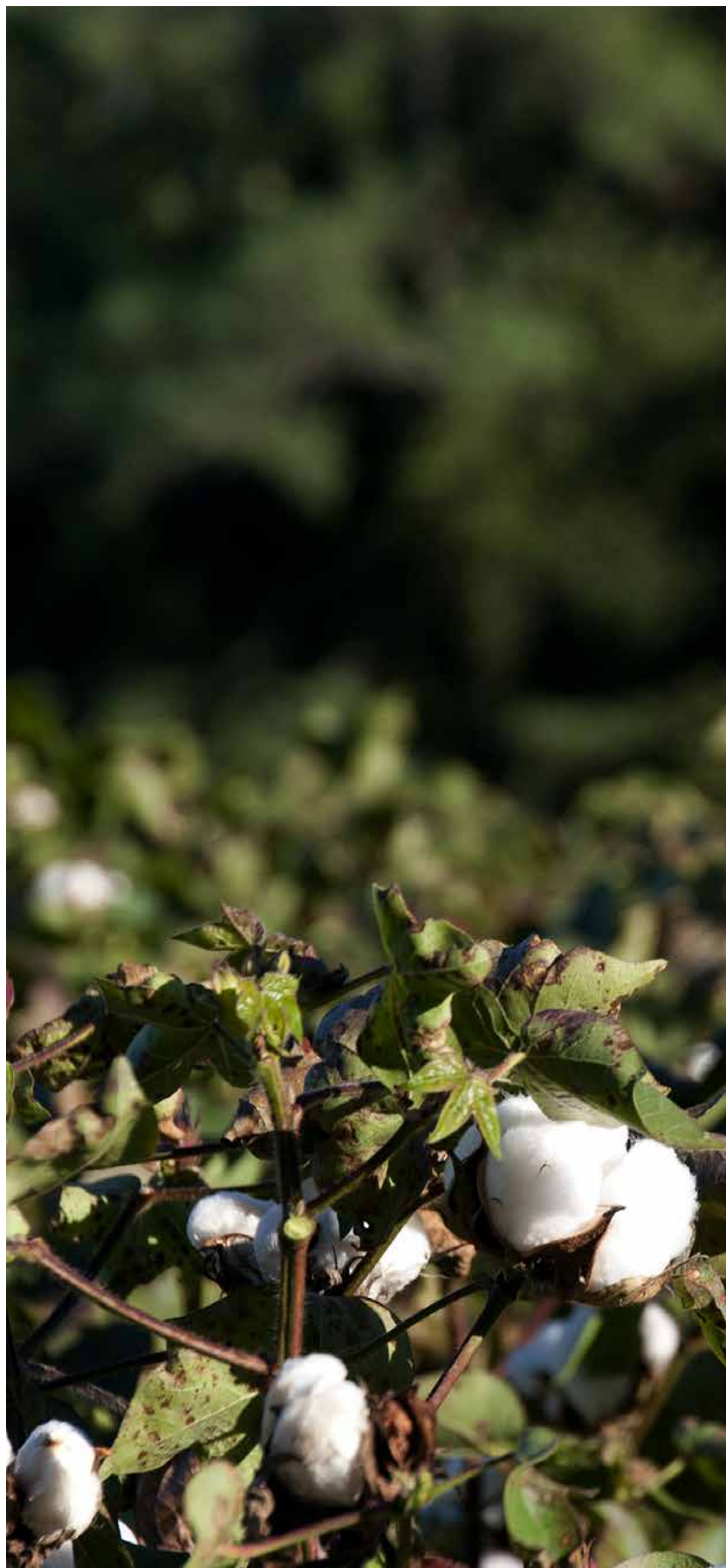


Durante el proceso de fermentación de las cepas de *A. chroococcum*, se verifica la pureza del caldo de cultivo mediante tinción de Gram, y por medio de un potenciómetro se hace un monitoreo del pH, ya que, durante una adecuada fermentación de las cepas, este tiende a aumentar, así que un cambio en este comportamiento puede ser debido a la presencia de contaminantes en el medio de cultivo. Al finalizar la fermentación y antes de pasar a la etapa de formulación, se realiza una cuantificación de las células viables presentes, utilizando la metodología de recuento en placa por microgota (Figura 6.3b) (Doyle et al., 2001),

y se determina el contenido de contaminantes como se explicó anteriormente. Finalmente, al producto terminado se le realiza un proceso de control de calidad que consiste en cuantificar células viables y contaminantes y determinar el pH y la viscosidad, empleando métodos potenciométricos y de viscosímetro rotacional de disco, respectivamente. Con respecto a la actividad biológica, esta se determina mediante el método de actividad reductora de acetileno, procedimiento estandarizado en el Laboratorio de Química de Suelos de AGROSAVIA (Obando Castellanos et al., 2010).

La implementación de estándares de calidad permite verificar que los parámetros evaluados en el control de calidad sean adecuados a las necesidades de los consumidores finales y aseguren la eficacia del biofertilizante (Deaker et al., 2011). Por otra parte, la regulación permite disminuir la competencia con productos de baja calidad y mejorar la aceptación y el posicionamiento del producto en el mercado (Herridge et al., 2002). Hasta el momento no existen estándares de calidad definidos globalmente, por lo que tienden a variar de país en país (Benintende, 2010; Deaker et al., 2011; Lupwayi et al., 2000; Stephens & Rask, 2000; Sun et al., 2006). Sin embargo, los valores mínimos actuales permitidos para biofertilizantes corresponden a concentraciones entre 10^6 y 10^9 UFC g^{-1} o mL^{-1} para productos recién elaborados (Benintende, 2010; Lupwayi et al., 2000; Sethi & Adhikary, 2012). En algunos países se exige la ausencia total de contaminantes, mientras que en otros está permitido un máximo del 0,001 % de contaminantes con respecto a la concentración del principio activo o una concentración máxima de 10^5 UFC g^{-1} o mL^{-1} (Benintende, 2010; Lupwayi et al., 2000; Sethi & Adhikary, 2012).

En Colombia, el registro y la vigilancia de estos bioproductos está a cargo del ICA, que tiene en cuenta los estándares de calidad sugeridos en la Norma Técnica Colombiana (NTC) 5842, "Bioinsumos para uso agrícola. Inoculantes biológicos. Requisitos" (Icontec, 2018). En ella se establece que los biofertilizantes deben presentar una concentración mínima, antes de su vencimiento, de 10^4 UFC mL^{-1} o g^{-1} , y en el caso de biofertilizantes a base de micorrizas, entre 5 y 10 esporas mL^{-1} o UFC g^{-1} por cada cepa presente en el cultivo. En cuanto a la pureza, esta debe ser mayor o igual al 95 %, con respecto a la concentración del principio activo, y poseer una actividad biológica superior o igual al 90 %, o estadísticamente significativa con respecto al control. Las propiedades fisicoquímicas como pH, contenido de humedad y densidad son especificadas por cada productor.



Referencias

- Adholeya, A., & Das, M. (2012). Biofertilizers: Potential for crop improvement under stressed conditions. En N. Tuteja, S. Singh Gill, & R. Tuteja (eds.), *Improving crop productivity in sustainable agriculture* (pp. 183-200). Wiley-Blackwell. <https://doi.org/10.1002/9783527665334.ch9>
- Ali, S., Ali, M. F., Sameer, M., & Rafique, Z. (2018). A review scale up fermentation procedure. *International Journal of Scientific Research in Science and Technology*, 4, 1.301-1.307. https://www.academia.edu/37123900/A_Review_Scale_Up_Fermentation_Procedure
- Bashan, Y., de-Bashan, L. E., Prabhu, S. R., & Hernandez, J.-P. (2014). Advances in plant growth-promoting bacterial inoculant technology: Formulations and practical perspectives (1998-2013). *Plant and Soil*, 378(1), 1-33. <https://doi.org/10.1007/s11104-013-1956-x>
- Becerra, J. M., Quintero, D., Martínez, M., & Matiz, A. (2011). Caracterización de microorganismos solubilizadores de fosfato aislados de suelos destinados al cultivo de uchuva (*Physalis peruviana* L.). *Revista Colombiana de Ciencias Hortícolas*, 5(2), 195-208. https://revistas.upc.edu.co/index.php/ciencias_hortícolas/article/view/1265
- Benintende, S. M. (2010). Calidad de inoculantes comerciales para el cultivo de soja en la Argentina: concentración de rizobios viables y presencia de contaminantes. *Revista Argentina de Microbiología*, 42(2), 129-132. https://www.researchgate.net/publication/262652456_Calidad_de_inoculantes_comerciales_para_el_cultivo_de_soja_en_la_Argentina_concentracion_de_rizobios_viables_y_presencia_de_contaminantes
- Bharti, N., Sharma, S. K., Saini, S., Verma, A., Nimonkar, Y., & Prakash, O. (2017). Microbial plant probiotics: Problems in application and formulation. En V. Kumar, M. Kumar, S. Sharma, & R. Prasad (eds.), *Probiotics and plant health* (pp. 317-335). Springer. https://doi.org/10.1007/978-981-10-3473-2_13
- Burges, H. D. (2012). *Formulation of microbial biopesticides: Beneficial microorganisms, nematodes and seed treatments*. Springer.
- Crater, J. S., & Lievense, J. C. (2018). Scale-up of industrial microbial processes. *FEMS Microbiology Letters*, 365(13). <https://doi.org/10.1093/femsle/fny138>
- Da Silva, M. F., de Souza Antônio, C., de Oliveira, P. J., Xavier, G. R., Rumjanek, N. G., de Barros Soares, L. H., & Reis, V. M. (2012). Survival of endophytic bacteria in polymer-based inoculants and efficiency of their application to sugarcane. *Plant and Soil*, 356(1), 231-243. <https://doi.org/10.1007/s11104-012-1242-3>
- Deaker, R., Kecskés, M. L., Rose, M. T., Amprayn, K., Krishnen, G., Cuc, T. T. K., Nga, V. T., Cong, P. T., Hien, N. T., & Kennedy, I. R. (2011). *Practical methods for the quality control of inoculant biofertilisers*. Australian Centre for International Agricultural Research (ACIAR).
- Doyle, M. P., Beuchat, L. R., & Montville, T. J. (coords.). (2001). *Microbiología de los alimentos: fundamentos y fronteras*. Acribia.

- Du Jardin, P. (2015). Plant biostimulants: Definition, concept, main categories and regulation. *Scientia Horticulturae*, 196, 3-14. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2015.09.021>
- Eckert, B., Weber, O. B., Kirchof, G., Halbritter, A., Stoffels, M., & Hartmann, A. (2001). *Azospirillum doebereineriae* sp. nov., a nitrogen-fixing bacterium associated with the C4-grass *Miscanthus*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 51(1), 17-26. <https://doi.org/https://doi.org/10.1099/00207713-51-1-17>
- Herrmann, L., Atieno, M., Brau, L., & Lesueur, D. (2015). Microbial quality of commercial inoculants to increase BNF and nutrient use efficiency. En F. J. de Bruijn (ed.), *Biological nitrogen fixation* (pp. 1.031-1.040). John Wiley & Sons. <https://doi.org/10.1002/9781119053095.ch101>
- Herridge, D., Gemell, G., & Hartley, E. (2002). Legume inoculants and quality control. *Australian Centre for International Agricultural Research Proceedings*, 109c, 105-115. <https://citeseerx.ist.psu.edu/viewdoc/download?doi=10.1.1.465.1854&rep=rep1&type=pdf>
- Herridge, D. F., & Peoples, M. B. (1990). Ureide assay for measuring nitrogen fixation by nodulated soybean calibrated by 15n methods. *Plant Physiology*, 93(2), 495. <https://doi.org/10.1104/pp.93.2.495>
- Herrmann, L., & Lesueur, D. (2013). Challenges of formulation and quality of biofertilizers for successful inoculation. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 97(20), 8.859-8.873. <https://doi.org/10.1007/s00253-013-5228-8>
- Icontec. (2018). NTC 5842:2018. Bioinsumos para uso agrícola. Inoculantes biológicos. Requisitos.
- Instituto Colombiano Agropecuario (ICA). (2018). *Productos registrados bioinsumos - diciembre 30 de 2018*. <https://es.scribd.com/document/440425803/Productos-Registrados-Bioinsumos-Dic-30-2018>
- Jensen, E. S., Peoples, M. B., Boddey, R. M., Gresshoff, P. M., Hauggaard-Nielsen, H., Alves, B. J. R., & Morrison, M. J. (2012). Legumes for mitigation of climate change and the provision of feedstock for biofuels and biorefineries. A review. *Agronomy for Sustainable Development*, 32(2), 329-364. <https://doi.org/10.1007/s13593-011-0056-7>
- Kennedy, I. R. (2008). *Efficient nutrient use in rice production in Vietnam achieved using inoculant biofertilisers*. Australian Centre for International Agricultural Research.
- Kumaresan, G., & Reetha, D. (2011). Survival of *Azospirillum brasilense* in liquid formulation amended with different chemical additives. *Journal of Phytology*, 3(10), 48-51. <http://updatepublishing.com/journal/index.php/jp/article/download/2725/2704>
- Kushizaki, M., Ishizuka, J., & Akamatsu, F. (1964). Physiological studies on the nutrition of soybean plants. 2 Effect of nodulation on the nitrogen constituent. *Journal of the Science of Soil and Manure*, 35, 323-327.
- Laranjo, M., Alexandre, A., & Oliveira, S. (2014). Legume growth-promoting rhizobia: An overview on the *Mesorhizobium* genus. *Microbiological Research*, 169(1), 2-17. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2013.09.012>
- Lee, S.-K., Lur, H.-S., Lo, K.-J., Cheng, K.-C., Chuang, C.-C., Tang, S.-J., Yang, Z.-W., & Liu, C.-T. (2016). Evaluation of the effects of different liquid inoculant formulations on the survival and plant-growth-promoting efficiency of *Rhodospseudomonas palustris* strain PS3. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 100(18), 7.977-7.987. <https://doi.org/10.1007/s00253-016-7582-9>
- Lobo, C. B., Juárez Tomás, M. S., Viruel, E., Ferrero, M. A., & Lucca, M. E. (2019). Development of low-cost formulations of plant growth-promoting bacteria to be used as inoculants in beneficial agricultural technologies. *Microbiological Research*, 219, 12-25. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2018.10.012>
- Lupwayi, N. Z., Olsen, P. E., Sande, E. S., Keyser, H. H., Collins, M. M., Singleton, P. W., & Rice, W. A. (2000). Inoculant quality and its evaluation. *Field Crops Research*, 65(2-3), 259-270. [https://doi.org/10.1016/S0378-4290\(99\)00091-X](https://doi.org/10.1016/S0378-4290(99)00091-X)
- Malusá, E., Sas-Paszt, L., & Ciesielska, J. (2012). Technologies for beneficial microorganisms inocula used as biofertilizers. *The Scientific World Journal*, 2012, artículo 491206. <https://doi.org/10.1100/2012/491206>
- Malusá, E., & Vassilev, N. (2014). A contribution to set a legal framework for biofertilisers. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 98(15), 6.599-6.607. <https://doi.org/10.1007/s00253-014-5828-y>
- Marcelino, P. R. F., Milani, K. M. L., Mali, S., dos Santos, O. J. A. P., & de Oliveira, A. L. M. (2016). Formulations of polymeric biodegradable low-cost foam by melt extrusion to deliver plant growth-promoting bacteria in agricultural systems. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 100(16), 7.323-7.338. <https://doi.org/10.1007/s00253-016-7566-9>
- Miles, A. A., Misra, S. S., & Irwin, J. O. (1938). The estimation of the bactericidal power of the blood. *Epidemiology & Infection*, 38(6), 732-749. <https://doi.org/10.1017/S002217240001158X>
- 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
- Obando Castellanos, D. M., Burgos Zabala, L. B., Rivera Botía, D. M., Rubiano Garrido, M. F., Bonilla Buitrago, R. R., & Divan Baldani, V. L. (2010). Caracterización de bacterias diazotróficas asimbióticas asociadas al eucalipto (*Eucalyptus* sp.) en Codazzi, Cesar (Colombia). *Acta Biológica Colombiana*, 15(3), 107-120. <https://revistas.unal.edu.co/index.php/actabiol/article/view/13529>
- Ohyama, T., & Pham, V. (2006). General methods to evaluate microbial activity. En Japan Atomic Industrial Forum (JAIF, ed.), *Biofertilizer manual* (pp. 3-17). https://www.fnca.mext.go.jp/bf/bfm/pdf/Biofertilizer_Manual.pdf
- Oliveira, A. L. M., Santos, O. J. A. P., Marcelino, P. R. F., Milani, K. M. L., Zuluaga, M. Y. A., Zucareli, C., & Gonçalves, L. S. A. (2017). Maize inoculation with *Azospirillum brasilense* Ab-V5 cells enriched with exopolysaccharides and polyhydroxybutyrate results in high productivity under low N fertilizer input. *Frontiers in Microbiology*, 8, artículo 1873. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.01873>

- Otalora, J., Patiño, M., Martínez, M., & Pedroza, A. (2003). *Estandarización de prueba para la detección de fosfatasa producida por bacterias solubilizadoras de fosfatos* [tesis de grado, Pontificia Universidad Javeriana].
- Perez, J. J., Francois, N. J., Maroniche, G. A., Borrajo, M. P., Pereyra, M. A., & Creus, C. M. (2018). A novel, green, low-cost chitosan-starch hydrogel as potential delivery system for plant growth-promoting bacteria. *Carbohydrate Polymers*, *202*, 409-417. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2018.07.084>
- Quiroga-Cubides, G., Díaz, A., & Gómez, M. (2017). Adjustment and scale-up strategy of pilot liquid fermentation process of *Azotobacter* sp. *International Journal of Bioengineering Life Sciences*, *11*(4), 322-330. <https://publications.waset.org/10007055/adjustment-and-scale-up-strategy-of-pilot-liquid-fermentation-process-of-azotobacter-sp>
- Rodríguez, H., & Fraga, R. (1999). Phosphate solubilizing bacteria and their role in plant growth promotion. *Biotechnology Advances*, *17*(4-5), 319-339. [https://doi.org/10.1016/S0734-9750\(99\)00014-2](https://doi.org/10.1016/S0734-9750(99)00014-2)
- San Juan, A. N., Pérez, J. A., Borges, D., Gómez, E., Pérez, M., Guevara, Y., Serrano, J., Pérez, J., Oliva, L., Casa, M., Martínez, J., Saura, G., Pérez, J. A., & Lorenzo, M. (2013). Escalado de la producción del biofertilizante Nitrofix en la planta de Bioproductos Cuba 10. En Icidca (ed.), *Memorias diversificación 2013*.
- Schoebitz, M., López, M. D., & Roldán, A. (2013). Bioencapsulation of microbial inoculants for better soil-plant fertilization. A review. *Agronomy for Sustainable Development*, *33*(4), 751-765. <https://doi.org/10.1007/s13593-013-0142-0>
- Sethi, S. K., & Adhikary, S. P. (2012). Cost effective pilot scale production of biofertilizer using *Rhizobium* and *Azotobacter*. *African Journal of Biotechnology*, *11*(70), 13.490-13.493. <https://doi.org/10.5897/AJBx11.012>
- Sharma, S. B., Sayyed, R. Z., Trivedi, M. H., & Gobi, T. A. (2013). Phosphate solubilizing microbes: Sustainable approach for managing phosphorus deficiency in agricultural soils. *SpringerPlus*, *2*(1), artículo 587. <https://doi.org/10.1186/2193-1801-2-587>
- 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)
- Sun, J. S., Jiarong, P., Toan, P. V., Patiyuth, S., Anarna, J. A., & Rahim, K. B. A. (2006). *Quality control of biofertilizers*. En Japan Atomic Industrial Forum (JAIF, ed.), *Biofertilizer manual* (pp. 112-124). https://www.fnca.mext.go.jp/bf/bfm/pdf/Biofertilizer_Manual.pdf
- Tabassum, B., Khan, A., Tariq, M., Ramzan, M., Iqbal Khan, M. S., Shahid, N., & Aaliya, K. (2017). Bottlenecks in commercialisation and future prospects of PGPR. *Applied Soil Ecology*, *121*, 102-117. <https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2017.09.030>
- Thilakarathna, M. S., & Raizada, M. N. (2017). A meta-analysis of the effectiveness of diverse rhizobia inoculants on soybean traits under field conditions. *Soil Biology and Biochemistry*, *105*, 177-196. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2016.11.022>
- Thompson, A. (1984). *Production and quality control of carrier-based legume inoculants* International Crops Research Institute for the Semi-Arid Tropics.
- Turner, G., & Gibson, A. (1980). Measurement of nitrogen fixation by indirect means. En F. J. Bergersen (ed.), *Methods for evaluating nitrogen fixation* (pp. 111-138). John Siley and Sons.
- Valero, N. (2003). *Potencial biofertilizante de bacterias diazotróficas y solubilizadoras de fosfatos asociados a cultivos de arroz (Oryza sativa L.)* [tesis de maestría, Universidad Nacional de Colombia].
- Vessey, J. K. (2003). Plant growth promoting rhizobacteria as biofertilizers. *Plant and Soil*, *255*, 571-586. <https://doi.org/10.1023/A:1026037216893>
- Vose, P. B., Ruschel, A. P., Victoria, R. L., Saito, S. M. T., & Matsui, E. (1982). ¹⁵N as a tool in biological nitrogen fixation research. En P. H. Graham, & S. C. Harris (eds.), *Biological nitrogen fixation technology for tropical agriculture* (pp. 575-592). CIAT.
- Witty, J. F., & Minchin, F. R. (1998). Methods for the continuous measurement of O₂ consumption and H₂ production by nodulated legume root systems. *Journal of Experimental Botany*, *49*(323), 1.041-1.047. <https://doi.org/10.1093/jxb/49.323.1041>
- Yadav, A. K., & Chandra, K. (2014). Mass production and quality control of microbial inoculants. *Proceedings of the Indian National Science Academy*, *80*(2), 483-489. <https://doi.org/10.16943/ptinsa/2014/v80i2/5>
- Young, C.-C. (2007). Development and application of biofertilizers in the Republic of China. En Asian Productivity Organization (ed.), *Business potential for agricultural biotechnology* (pp. 51-57). https://www.apo-tokyo.org/publications/wp-content/uploads/sites/5/agr-19-bp_abp.pdf