

Producción y formulación de prototipos de un biofertilizante a partir de bacterias nativas asociadas al cultivo de arroz (*Oryza sativa*)

Producing and formulating a prototype biofertiliser from a native bacterial strain associated with rice (*Oryza sativa*)

Johanna Rojas Sierra¹, Nubia Moreno-Sarmiento²

Resumen

Los biofertilizantes son productos con base en microorganismos que están involucrados en los procesos nutritivos de las plantas. Además de los microorganismos, es necesario mejorar las condiciones de formulación de los productos para mantener la viabilidad y estabilidad en almacenamiento y campo. El objetivo de este trabajo fue evaluar formulaciones, las cuales se realizaron mezclando el ingrediente activo (bacteria fijadora de nitrógeno) en diferentes relaciones con sustancias húmicas, Polietilenglicol, Carbopol® y quelatos. Los prototipos que mantuvieron la viabilidad durante un periodo de aproximadamente tres meses se evaluaron en cultivos de arroz. Los formulados se evaluaron teniendo en cuenta la dosis aplicada (1 y 2 L/ha); el resultado de uno de los prototipos (M= 8500 kg/ha) mostró un efecto benéfico sobre la producción superando a los testigos (7625 kg/ha). Los resultados de este trabajo, además de contribuir con el aumento de la estabilidad en almacenamiento de algunos prototipos, permitieron mostrar buenos resultados en campo (producción), ratificando la importancia que tienen estos microorganismos en los agroecosistemas.

Palabras clave: biofertilizantes, formulación, nutrición vegetal, prototipos, sustancias húmicas.

Abstract

Biofertilisers are products based on microorganisms involved in plants' nutritional processes. As well as the microorganisms, the products' formulation conditions must be improved for maintaining viability and stability during storage and in the field. This investigation evaluated formulation stability and viability; this was done by mixing an active ingredient (a nitrogen-fixing strain) humic substances, polyethyleneglycol, Carbopol and chelates, in several ratios. Prototypes maintaining their viability for around 3 months were evaluated on rice crops in the field. Formulations were evaluated considering the applied dose (1 and 2 L/ha); one of these formulations (M = 8,500 Kg/ha) showed an increased beneficial effect regarding the controls (7,625 Kg/ha) in terms of rice crop yield. The results obtained in this work are promissory since they contribute towards increasing

1 Bióloga, MSc Microbiología, Facultad de Educación y Ciencias, Departamento de Biología, Universidad de Sucre, Sincelejo. rojas_johanna@yahoo.com

2 Ingeniera Química Msc Ingeniería Química, MSc Biotecnología Instituto de Biotecnología, Dpto. Ingeniería Química-Facultad de Ingeniería Universidad Nacional de Colombia-Sede Bogotá ncmorenos@unal.edu.co

not only formulation/prototype storage stability but also rice yields when using such formulations as biofertilisers on rice crops. This work ratifies the importance of plant-growth promoting bacteria in agrosystems.

Key words: Biofertiliser, formulation, humic substance, plant nutrition, prototype.

Recibido: septiembre 18 de 2008

Aprobado: noviembre 19 de 2008

Introducción

Durante los últimos años la agricultura se ha caracterizado por el uso intensivo de fertilizantes químicos y plaguicidas para mantener altas producciones, sin tener en cuenta que se ocasiona destrucción de los agroecosistemas, evidenciado principalmente en la pérdida de productividad de los suelos, alteración de la calidad de los productos agrícolas, contaminación del ambiente y problemas de salud en la población (Higa y Parr, 1994). Esta problemática se ha extendido a diferentes cultivos, siendo de especial interés para nuestro país el cultivo de arroz, por ser un alimento básico en la dieta, y por la importancia económica que representa. En este cultivo la eficiencia de los fertilizantes químicos aplicados es muy baja, lo cual ocasiona que se aplique más fertilizante del realmente necesario, trayendo las consecuencias antes mencionadas y, además, incrementos en los costos de producción (Castilla, 2000).

Este impacto negativo generó el desarrollo de tecnologías que involucran microorganismos benéficos y efectivos, los cuales tienen la capacidad de favorecer procesos esenciales para la nutrición de las plantas (Vessey, 2003). En Colombia, uno de los grupos que ha venido desarrollando este tipo de biotecnologías es el conformado por el Laboratorio de Fermentaciones del Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional de Colombia (IBUN), la empresa privada Biocultivos S.A. y la Federación Nacional de Arroceros (Fedearroz). Este grupo de investigación cuenta en la actualidad con tres biofertilizantes (Dimazos[®], Dimargon[®], Fosfosol[®]) y un biocontrolador

(Trifisol[®]), los cuales demostraron mejorar la rentabilidad de los cultivos, principalmente el de arroz, mediante la reducción de los costos y el incremento en la calidad y cantidad de la producción (Echeverri y Castilla, 2008; Moreno et ál., 2004).

A pesar de que en la actualidad se ofrecen productos biológicos que han mostrado beneficios en los rendimientos de producción, es necesario realizar estudios dirigidos hacia el desarrollo de nuevas formulaciones que permitan que los productos tengan una mejor estabilidad en almacenamiento y mantengan la actividad al ser aplicados en campo (Echeverri y Castilla, 2008; Moreno et ál., 2004). El objetivo de este trabajo fue evaluar diferentes formulaciones de prototipos de un biofertilizante, para los cuales el ingrediente activo fue la bacteria fijadora de nitrógeno *Azotobacter* sp. Se utilizaron sustancias húmicas como diluyente, debido a que su naturaleza orgánica no afecta a los microorganismos y, además, proporcionan efectos favorables en el suelo; los coadyuvantes Polietilenglicol (PEG) y Carbopol[®] se utilizaron como agentes de suspensión, y los quelatos tenían la función de aumentar la efectividad del formulado a través del mejoramiento nutritivo de las plantas (Visser, 1985; Kibbe, 2000; Hernández-Apaolaza, 1997). Para la obtención del ingrediente activo se establecieron las condiciones de producción del *Azotobacter* sp. en matraz y en fermentador de siete litros. En forma simultánea se realizaron ensayos de actividades específicas para garantizar que la cepa mantenía el potencial biofertilizante por el cual fue seleccionada. Finalmente, para demostrar la efectividad de las formulaciones, se realizaron los ensayos en cultivos de arroz, en el

norte del Tolima, Colombia, con los formulados que mantuvieron viabilidad por aproximadamente tres meses.

Materiales y métodos

Microorganismo

El *Azotobacter* sp. se aisló de suelos agrícolas arroceros del departamento del Tolima, Colombia. Esta cepa se seleccionó debido a que mostró, en condiciones semi-controladas *in vitro* e invernadero, potencialidad para promover el crecimiento de las plantas de arroz. La cepa se clasificó de acuerdo con la actividad metabólica observada como una bacteria fijadora de nitrógeno del género *Azotobacter* (BFN 25) (Valero, 2003). Se tuvo especial interés en esta actividad debido a que el nitrógeno se considera el elemento nutritivo que influye en mayor proporción sobre la producción, debido a que aumenta el porcentaje de espiguillas rellenas, incrementa la superficie foliar y contribuye al aumento de calidad del grano (Degiovanni et ál., 1989).

Establecimiento de las condiciones de producción a nivel de laboratorio (matraz)

Evaluación preliminar de diversas fuentes de carbono y nitrógeno (C/N): las bacterias fijadoras de nitrógeno son exigentes en los requerimientos nutricionales, principalmente con las fuentes de carbono y nitrógeno (Balows et ál., 1992). Por lo anterior, se evaluaron relaciones entre la fuente de carbono (sacarosa, fructosa y glucosa) y de nitrógeno (combinación de extracto de levadura y nitrato de amonio, nitrato de amonio y urea). Se mantuvo la proporción C/N constante con respecto al medio “estándar” utilizado en el laboratorio de fermentaciones del Instituto de Biotecnología. Los ensayos se realizaron por duplicado, se incubaron a una temperatura de 30° C y agitación orbital “shaker” de 170 rpm. Se tomaron muestras a las 12, 24 y 36 horas para evaluar la biomasa en unidades formadoras de colonia por mililitro (UFC/mL) y medir el consumo de sustrato por el método colorimé-

trico del ácido dinitrosalicílico (DNS). Con base en estos dos parámetros se realizó la selección del medio de cultivo que permitiera obtener la mayor biomasa microbiana (Moreno y Buitrago, 2003).

Evaluación de diferentes concentraciones de carbono y nitrógeno: luego de determinar la fuente de carbono y de nitrógeno se procedió a evaluar tres concentraciones diferentes para cada una de ellas. Se evaluaron los niveles alto, medio y bajo, el nivel medio corresponde a la concentración del medio “estándar”. Los ensayos se realizaron por duplicado, se conservaron las condiciones de operación de los ensayos preliminares y se evaluaron las mismas variables respuestas (Moreno y Buitrago, 2003).

Evaluación de actividades específicas

- *Ensayo de actividad nitrogenasa:* se empleó la metodología aplicada por Dobereiner (1997) modificada por Lozano (1998). El *Azotobacter* sp. se cultivó en caldo nutritivo durante 24 horas, se tomaron 100 µL, los cuales se inocularon en frascos de 20 mL de capacidad que contenían 7 mL de medio libre de nitrógeno (medio NFB) e incubados durante 24 horas. Posteriormente, se reemplazó el 5% de la atmósfera del frasco por un volumen igual de acetileno. Los frascos se incubaron durante 2 horas a temperatura ambiente. Muestras de 1 mL fueron inyectadas en el cromatógrafo de gases Varian, y se utilizó la columna Hayesep N 80100, las condiciones de operación fueron: temperatura de la columna de 50° C, flujo de 15 mL/min, y como gas de arrastre, nitrógeno. Los cálculos de la cantidad de nanomoles de etileno producido se hacen por medio de la interpolación de una curva de calibración con concentraciones conocidas de etileno, de tal manera que con estos datos se relaciona el área del pico de etileno que registra el cromatógrafo de gases. Se utilizó como cepa de referencia *Azotobacter*

chroococcum ATCC 9043 y se realizaron 4 réplicas por cada bacteria.

- *Ensayo cuantitativo para solubilización de fosfatos*: en tubos falcon de 50 mL se preparó un preinóculo de 5 mL con medio SRS líquido (Sundara y Sinha, 1963) el cual contenía fosfato soluble (fosfato de potasio). Se incubó durante 20 horas a una temperatura de 30° C y en agitación orbital a 160 rpm. Los tubos se centrifugaron a 5000 g por 2 min, se descartó el sobrenadante y se lavó 3 veces el precipitado obtenido con una solución de cloruro de sodio al 0,2% (P/V). La biomasa se resuspendió en 1 mL de esta misma solución; se tomaron alícuotas de 200 µL de esta suspensión bacteriana y se adicionó a tubos Falcon que contenían 20 mL de medio SRS líquido con fosfato insoluble (inóculo). Se utilizó medio SRS libre de microorganismos como control. Todos los cultivos se incubaron durante 24 horas a las condiciones anteriormente mencionadas, y al final se tomó la lectura de pH. Transcurrido este tiempo, los medios de cultivo se centrifugaron a 7000 rpm durante 15 minutos para recuperar el sobrenadante. Las muestras se prepararon utilizando 500 µL del sobrenadante obtenido en el paso anterior, 4,5 mL de agua desionizada estéril y 1,2 mL del reactivo Spectro Quant Merck “Phosphate test”, y se agitaron en vortex para su lectura en el espectrofotómetro Merck SQ 118. El mismo procedimiento de preparación de muestra se realizó con el control y con el blanco (5 mL de agua desionizada más el reactivo) (Vásquez et ál., 2000). Se utilizó como cepa de referencia el hongo *Penicillium janthinellum* (aislada en el laboratorio de Microbiología del Suelo del Departamento de Biología de la Universidad Nacional de Colombia), y se realizaron 3 réplicas por cada microorganismo.

Ensayos de producción en fermentador de 7 L

Luego de seleccionar el medio de cultivo a nivel de matraz, se realizaron por duplicado los ensayos de fermentación en el biorreactor de 7 L Bioflo III, en el cual se puede medir y controlar la temperatura, la agitación, el pH, adición de ácido o base y oxígeno disuelto. Las condiciones de operación fueron: volumen de trabajo de 5 L; siembra de preinóculo con una azada desde agar nutritivo; volumen de preinóculo de 50 mL; volumen de inóculo de 450 mL; temperatura de 30° C; agitación de 300 rpm; aireación de 1 vvm y pH inicial del medio de 7,0. Del reactor se tomaron muestras cada 4 horas para evaluar UFC/mL, y consumo de sustrato por el método DNS, parámetro con el que se determina la finalización de la fermentación. Se evaluó el comportamiento en el tiempo de pH y oxígeno disuelto (OD) (Moreno y Buitrago, 2003).

Formulación

Se realizaron mezclas con el ingrediente activo, que es la biomasa proveniente de cultivos con la cepa BFN 25, asegurando una concentración inicial de 5×10^8 UFC/mL, en diferentes relaciones con las sustancias húmicas (como diluyente) y los coadyuvantes quelatos de hierro y magnesio, PEG y Carbopol®. Las mezclas se almacenaron inmediatamente a 15 °C y 30 °C (tabla 1) (Burges, 1998). Luego de un tiempo de 75 días, los formulados que mantuvieron una concentración mínima de 1×10^8 UFC/mL, se enviaron a campo para evaluar su eficiencia.

En el laboratorio se mantenían muestras de los productos que se enviaron a campo para realizar seguimiento de la viabilidad con respecto al tiempo y la temperatura. Se utilizó una temperatura de 30 °C por considerarse la temperatura ambiente promedio que se presenta en los lugares en donde se cultiva el arroz, y se utilizó una temperatura de 15 °C por corresponder a la temperatura promedio del laboratorio donde se realiza el proceso de producción y almacenamiento de los productos biológicos.

Tabla 1. Formulación del ingrediente activo

Formulados Temperatura de almacenamiento		Ingrediente activo (mL)	Sustancias húmicas (mL)	Coadyuvantes
15 °C	T° 30 °C			
A1	A2	250	175	75 mL (10% PEG-5%Fe)
B1	B2	375	50	75 mL (10% PEG-5% Fe)
C1	C2	250	200	50 mL (5% PEG-5% Fe)
D1	D2	375	75	50 mL (5% PEG-5% Fe)
E1	E2	400	100 (Carbopol)	0
F		250	250	0
H1	H2	250	175	75 mL (10% PEG-5% mg)
I1	I2	375	50	75 mL (10% PEG-5% mg)
J1	J2	250	200	50 mL (5% PEG-5% mg)
K1	K2	375	75	50 mL (5% PEG-5% mg)
L1	L2	250	250 (125 s.h /125 Carbopol)	0
	M	250	250	0
	N	375	125	0
Control A	Control B	500	0	0

Evaluación de los formulados en campo

Los ensayos en campo se realizaron en zonas agrícolas ubicadas en el departamento de Tolima, Colombia, bajo la asesoría del Departamento Técnico de la empresa Biocultivos S.A., quienes se encargaron de aplicar los productos en el cultivo de arroz, variedad *orizyca 1*. Se incluyeron 3 testigos: a) 100% fertilización química (T = testigo absoluto), para lo cual se aplicó urea (nitrógeno), cloruro de potasio y DAP (fósforo); b) sustancias húmicas (AF = ácidos húmicos/fúlvicos), y c) producto biológico comercial, Dimazos® (bacterias *Azotobacter chroococcum* y *Azospirillum amazonense* en concentraciones de 1×10^8 UFC/mL). Se utilizó un diseño experimental de

bloques completamente al azar con tres repeticiones por producto, el tamaño de cada bloque o parcela fue de 50 m² (5 m x 10 m, aproximadamente 25000 plantas por parcela). Se evaluaron dosis de los formulados de 1 y 2 litros por hectárea los cuales se aplicaron a las parcelas a los 28 días después de la emergencia del arroz sin reducción de fertilización química. Durante el ciclo del cultivo se midieron el número de macollas, la altura de las plantas y la elongación radicular. Los registros se realizaron a los 10, 30, 45, y 60 días después de aplicarse el producto. Al final del cultivo se evaluó la producción mediante componentes de rendimiento, expresada en número de granos llenos y número de granos vanos; y rendimiento en grano, medido en kg por hectárea (Torres, 2002).

Programas estadísticos

Las herramientas computacionales utilizadas para los análisis estadísticos fueron en su totalidad del programa SAS, con excepción del análisis para evaluar los ensayos en campo correspondiente a los parámetros de altura de plantas y elongación radicular, para el cual se utilizó el programa SPSS.

Resultados y discusión

Establecimiento de las condiciones de producción a nivel de laboratorio (matraz)

Evaluación preliminar de diversas fuentes de carbono y nitrógeno (C/N)

En todos los resultados de las combinaciones de las diferentes fuentes de carbono y nitrógeno se observó crecimiento de la bacteria a las 12 y 24 horas, presentándose las mejores producciones cuando se utilizaron las combinaciones C/N correspondientes a todas las fuentes de carbono con nitrato de amonio, sin embargo, no hubo diferencias estadísticas significativas, el valor F fue de 0,216 y la probabilidad fue de 0,808 (mayor al nivel de significancia $\alpha=0,05$), razón por la cual el medio de cultivo seleccionado fue la combinación sacarosa/nitrato de amonio, además, en términos de rentabilidad es más económico emplear sacarosa que las otras fuentes.

Evaluación de diferentes concentraciones de sacarosa y nitrógeno

Las concentraciones que se evaluaron para sacarosa fueron 25, 30 y 35 g/L. Para el nitrato de amonio se evaluaron 2, 3 y 4 g/L. Los resultados muestran que en todas las combinaciones C/N hubo crecimiento hasta las 24 horas, pero en algunos casos este crecimiento no se mantuvo, sino que disminuyó al llegar a las 36 horas, lo cual se evidenció en todos los ensayos en donde se utilizó la concentración de 4 g/L de nitrato de amonio. Lo que sugiere

que 4 g/L de nitrato de amonio es una concentración muy alta para el microorganismo originando inhibición de crecimiento o muerte. Los otros ensayos mantuvieron su crecimiento hasta las 36 horas, siendo las combinaciones de 25/2 y 30/2 las que resultaron en mayor concentración de biomasa, mostrando de esta forma las mejores tendencias de crecimiento. El medio seleccionado para llevar al fermentador de 7 litros fue el de 25 g/L de sacarosa y 2 g/L de nitrato de amonio.

Evaluación de actividades específicas

- *Ensayo de actividad nitrogenasa:* los resultados de la actividad nitrogenasa para la cepa BFN 25 y *Azotobacter chroococcum*, fueron de 3151,8 y 2601,5 nanomoles de etileno/hora respectivamente. Se obtuvieron a partir de la reducción del acetileno inyectado y permiten evidenciar que las bacterias evaluadas presentan la actividad enzimática. Este resultado ratifica la importancia que tienen las bacterias de este género en procesos biológicos fundamentales como la fijación del nitrógeno y como consecuencia de ello la potencialidad para ser empleadas como biofertilizantes (Mayea et ál., 1998; Vessey, 2003).
- *Ensayo cuantitativo para solubilización de fosfatos:* los resultados de la cepa en estudio y del hongo *Penicillium janthinellum*, fueron de 76,6 y 145 mg/L de fósforo solubilizado respectivamente, mostrando que los dos microorganismos poseen la capacidad de solubilizar fosfatos. La diferencia entre *P. janthinellum* con respecto a la cepa BFN 25 era de esperarse debido a que *P. janthinellum* ha demostrado gran habilidad para ser utilizado como un efectivo solubilizador de fosfato, promoviendo de esta forma la nutrición en diversos cultivos (Torres, 2002). Se observó que en todos los ensayos el pH disminuyó hasta valores de 3,6

y 4,8, siendo menor para el hongo. Este resultado sugiere la posible liberación de ácidos orgánicos al medio, a los cuales se les atribuye en gran parte el efecto solubilizador (Illmer and Schinner, 1992). Si bien ésta no es la actividad por la cual fue seleccionada esta cepa, se realizó este ensayo debido a que la disminución del pH del medio de cultivo durante las evaluaciones preliminares sugirió esta posibilidad, lo cual aún se presume por los resultados obtenidos (Chen et ál., 2006).

Los resultados de los ensayos de actividades específicas realizados a la cepa BFN 25 evidencian el elevado potencial de *Azotobacter* sp. (BFN25) para ejercer un efecto benéfico en las plantas, actuando como promotor del crecimiento vegetal asociado a la fijación biológica de nitrógeno y solubilización de fosfatos.

Ensayos de producción en fermentador de 7 L

Las condiciones de operación para llevar a cabo la cinética de crecimiento en el fermentador se mencionaron en la metodología. Se cambió la velocidad de agitación a 200 rpm (figura 1). En estas fermentaciones se alcanzó una concentración de 10^9 UFC/mL a partir de las primeras 8 horas, y de allí en adelante prácticamente se mantuvo constante, observándose una baja velocidad de consumo de sacarosa. Como posibles factores que pudieron afectar el proceso se sugiere que la velocidad de agitación y el flujo de oxígeno (aireación) fueron insuficientes al no permitir una adecuada transferencia de masa (oxígeno), y a que la baja solubilidad del gas en el agua no suplió la demanda requerida por el cultivo, lo que condujo a la inhibición del crecimiento (Brauer, 1987).

Con el fin de mejorar las condiciones de fermentación para que *Azotobacter* sp. presentara un mayor crecimiento, se aumentó la velocidad de agitación a 300 rpm (figura 2). En este caso la concentración de microorganismos de 10^9 UFC/mL se obtuvo en las primeras 4

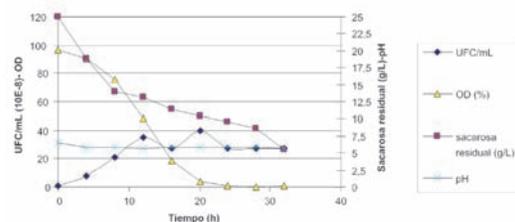


Figura 1. Cinéticas de crecimiento de la cepa BFN 25 con una velocidad de agitación de 200 rpm.

horas, alcanzando una concentración máxima del orden de 10^{10} UFC/mL a partir de la hora 16, lo cual demuestra que efectivamente la velocidad de agitación en el ensayo anterior fue baja y, por tanto, el crecimiento de la bacteria se afectó.

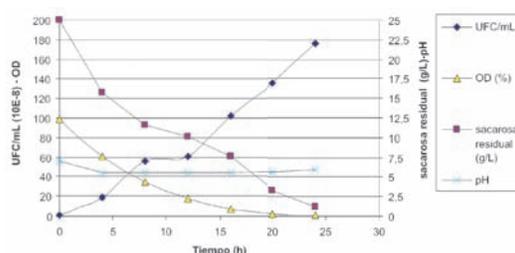


Figura 2. Cinéticas de crecimiento de la cepa BFN 25 con una velocidad de agitación de 300 rpm.

El valor de pH en los dos casos presentó una leve disminución durante las primeras horas, manteniéndose alrededor de 5,8. Este nivel de pH se encuentra dentro de los límites adecuados en que la bacteria es capaz de sobrevivir (5,5-8,5). Con respecto al oxígeno disuelto se observa que en todos los ensayos entre las 16 y 20 horas de fermentación el oxígeno disuelto cae prácticamente a cero, sin embargo, la bacteria sigue creciendo o manteniéndose, lo cual era de esperarse, debido a que *Azotobacter* sp., aunque es aerobio, puede crecer en condiciones de oxígeno limitado (Balows et ál., 1992).

Analizados los resultados anteriores se decidió que el ingrediente activo para la formulación se produciría utilizando 25 g/L de sacarosa, 2 g/L de nitrato de amonio y una ve-

locidad de agitación de 300 rpm, el suministro de oxígeno correspondiente a 1 vvm y el pH inicial del medio de 7,0

Formulación

Se prepararon los formulados que se indican en la tabla 1, asegurando una concentración inicial de 5×10^8 UFC/mL. A los 75 días de formulación se determinó cuáles de las mezclas mantuvieron la viabilidad en una concentración mínima del orden de 1×10^8 UFC/mL (tabla 2).

Como se observa en la tabla 2, en los controles se presentó disminución de la población bacteriana mientras que los formulados E1, E2, F, L1, L2, M y N mantuvieron la concentración deseada, razón por la cual se enviaron a campo para ser aplicados en el cultivo de arroz. Las formulaciones que llevaron coadyuvantes como magnesio y hierro mezclados con PEG no produjeron buenos resultados puesto que el ingrediente activo bajó considerablemente su población. Estos resultados desfavorables se explican posiblemente por la composición

química del polietilenglicol, el cual se utilizó como agente de suspensión y pudo presentar efectos de toxicidad sobre las bacterias. Al realizar la revisión bibliográfica se encontró que una ventaja de este coadyuvante es no permitir el crecimiento microbiano y por ello se utiliza ampliamente en la industria farmacéutica (Kibbe, 2000). El seguimiento realizado a los siete formulados y los controles mostraron que después de 105 días de formulación, los productos E1, F, M y N mantenían su concentración en 10^8 UFC/mL. Uno de los problemas de la comercialización de los productos biológicos es el tiempo de vida en anaquel, razón por la cual los resultados de este trabajos son importantes, ya que en la mayoría de los casos, para lograr tiempos similares, es necesario mantener los productos en cadenas de frío, lo que genera incremento en los costos de comercialización.

Evaluación de los formulados en campo

Para el análisis de los resultados que se obtuvieron en campo se utilizó un modelo de

Tabla 2. Resultados de viabilidad de los productos a los 75 días de formulados

Formulados	UFC/mL	Formulado	UFC/mL
A1	2×10^7	I1	4×10^7
A2	$< 10^7$	I2	$< 10^7$
B1	2×10^7	J1	$< 10^7$
B2	$< 10^7$	J2	$< 10^7$
C1	8×10^7	K1	3×10^7
C2	$< 10^7$	K2	$< 10^7$
D1	1×10^7	*L1	1×10^8
D2	$< 10^7$	*L2	3×10^8
*E1	4×10^8	*M	5×10^8
*E2	3×10^8	*N	3×10^8
*F	2×10^8	1. Control AMB A	$< 10^7$
H1	7×10^7	2. Control 30 °C B	$< 10^7$
H2	1×10^7		

dos factores con interacción. Los dos factores que se tienen en cuenta son producto (cada uno de los formulados por evaluar, incluyendo dos de los testigos: producto comercial y sustancias húmicas), y dosis con dos niveles (1L y 2L/ha). Adicionalmente, se realizó la prueba de comparación múltiple de Duncan.

Análisis del comportamiento del número de macollas a través del ciclo del cultivo

Los resultados que se muestran en la figura 3 permiten observar que el mayor promedio de número de macollas durante todo el cultivo se obtiene con el testigo AF (sustancias húmicas), el formulado M y el testigo Dimazos®. Los menores promedios se presentaron en el testigo absoluto y en el formulado F. Este resultado refleja la importancia que tiene la concentración del producto sobre los resultados en campo, ya que M y F, a pesar de tener la misma formulación inicial el producto F presentó una concentración más baja al momento de aplicación en campo. Los resultados se observan en la tabla 2.

Análisis del comportamiento de altura de plantas a través del ciclo del cultivo

En la figura 4 se observa el comportamiento de la altura de plantas, mostrando que a medida que transcurre el tiempo, la variable aumenta independientemente del formulado o testigo evaluado. Se evidencia que las dife-

rencias entre todos los productos no son significativas, pues el valor F fue de 0,522 y su probabilidad de 0,668 (nivel de significancia de 0,05), aunque se nota un ligero incremento del testigo AF (sustancias húmicas), en prácticamente todo el ciclo del cultivo.

Análisis del comportamiento de elongación radicular a través del ciclo del cultivo

A diferencia del parámetro anterior, éste no evidenció concordancia con los diferentes tiempos evaluados, se explica porque en el momento de la toma de las muestras en campo el suelo no se encontraba suficientemente húmedo, y al extraer las plantas se provocaba maltrato y por ende un deterioro en las raíces, lo que originó que los datos mostraran resultados incongruentes.

Componentes de rendimiento (número de granos llenos y número de granos vanos)

La evaluación de producción concerniente a número de granos llenos y vanos no presentó diferencias estadísticas significativas (el valor F fue de 0,66 y 0,65, y las probabilidades de 0,8237 y 0,8361, respectivamente, con un nivel de significancia de 0,05). Sin embargo, se observó que el formulado M produjo la menor cantidad de granos vanos y la mayor cantidad de granos llenos con respecto a los otros for-

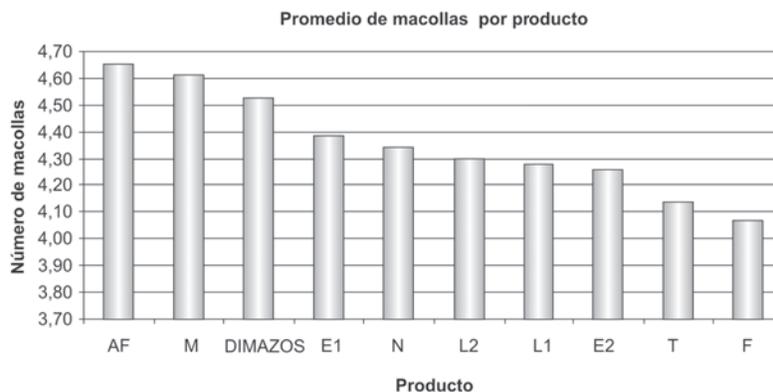


Figura 3. Promedio del número de macollas producidas por cada formulado durante el ciclo del cultivo.

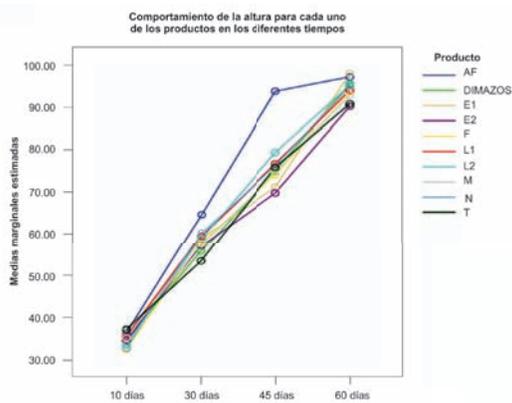


Figura 4. Comportamiento de la altura de las plantas para cada uno de los productos en los diferentes tiempos evaluados.

mulados incluyendo los tres testigos. Vale la pena resaltar que esta medida es una práctica cultural que realizan los agricultores para hacer un estimativo de la producción.

Rendimiento en grano (kg/ha)

Se considera la variable más importante de todos los resultados obtenidos en campo, debido a que determina la rentabilidad del cultivo. La figura 5 muestra los resultados arrojados al realizar la prueba de Duncan, en donde si bien en general existen diferencias estadísticas significativas entre los productos probados

en campo (valor F de 4,67 y probabilidad de 0,0003), también se puede observar que el producto comercial Dimazos presenta la mayor media, aunque no haya diferencia estadística significativa con respecto a los productos M, AF, L2 y L1, lo que indica que dichas diferencias son muy cercanas.

En cuanto al comportamiento de la variable producción en kg/ha, teniendo en cuenta la interacción producto a dosis aplicada, en la figura 6 se aprecia que el producto M, con la dosis de 1 L, presenta el mayor rendimiento (8500 kg/ha), seguido por los testigos sustancias húmicas (7687,5 kg/ha) y Dimazos® (7625 kg/ha) en la misma dosis. La importancia del resultado radica en que M ofrece ventajas competitivas con respecto a Dimazos®, debido a que en la formulación de este producto comercial el ingrediente activo se compone de dos bacterias. El producto Dimazos® muestra una escasa diferencia entre 1 y 2 L/ha, sugiriendo que la cantidad aplicada para este producto no altera los resultados.

Se logró evidenciar la superioridad de los productos biológicos tanto con base en microorganismos como en sustancias orgánicas, con respecto a las aplicaciones de fertilización química (T en la figura 6), con el que se obtuvo una producción de 6312,5 kg/ha. Lo que

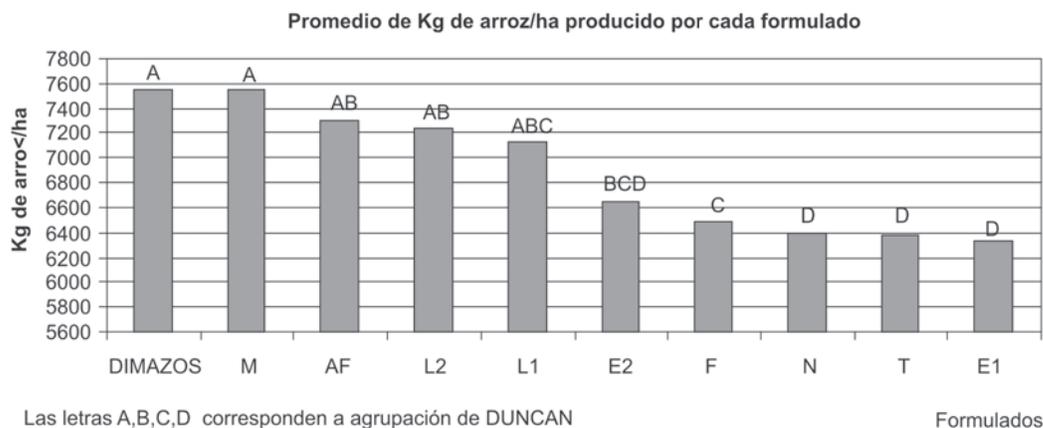


Figura 5. Kilogramos de arroz/ha producidos por cada formulado según agrupaciones de la prueba de Duncan.

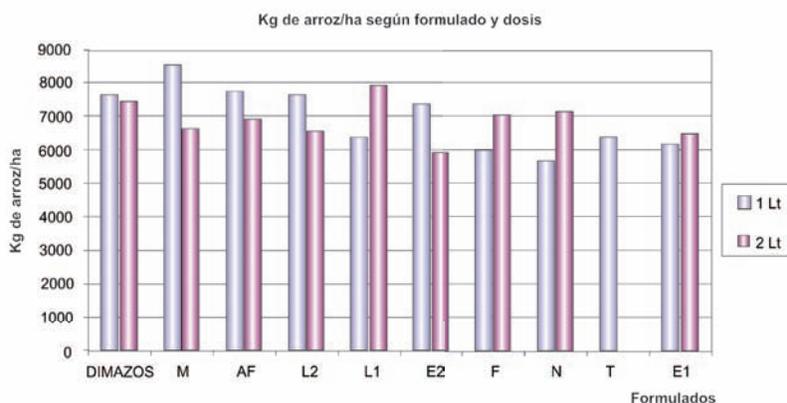


Figura 6. Kilogramos de arroz/ha producidos según el formulado y la dosis aplicada

podría ser ocasionado por la baja eficiencia de absorción de los químicos aplicados como se ha demostrado en otros trabajos (Higa y Parr, 1994), agudizando el problema de nutrición en las plantas y aumentando los riesgos de destrucción de los agroecosistemas, que se reflejan principalmente en la pérdida de productividad de los suelos, alteración de la calidad de los productos agrícolas, contaminación del ambiente y problemas de salud en la población.

De los tres parámetros que se evaluaron durante el ciclo del cultivo, la variable de número de macollas fue la única que mostró una tendencia relacionada con la elección de los productos que presentarían los mejores rendimientos de producción. Esto indica la importancia que representa para las plantas desarrollar la mayor cantidad de macollas, debido a que cada una dará origen a la panícula (inflorescencia) y, finalmente, es en ésta donde se producirán las semillas o granos (Degiovanni et ál., 1989).

Los resultados de producción en este ensayo son similares a los obtenidos por Echeverri y Castilla (2008), en el cual el uso de bacterias fijadoras de nitrógeno (BFN) aumenta la rentabilidad de los cultivos, pasando de 7500 kg de arroz/ha en el testigo a 9000 kg de arroz/ha cuando emplean BFN a los 15 días después de la emergencia del arroz. Estos resultados ilustran el efecto positivo del uso de microorganismos sobre las variables estudiadas

logrando una mayor eficiencia en la aplicación de los nutrientes, reflejada en menor cantidad de fertilizantes o mayor rendimiento del arroz (Echeverri y Castilla, 2008).

A nivel mundial, desde el punto de vista histórico, *Azotobacter* sp es el microorganismo que de una forma más amplia ha sido utilizado en la agricultura. Las primeras aplicaciones de estas bacterias datan de 1902, alcanzando una amplia utilización durante las décadas de los cuarenta, cincuenta y sesenta, particularmente en los países de Europa del Este (González y Lluch, 1992). La aplicación práctica de la inoculación de este diazótrofo ha sido positiva, observándose notables incrementos en los rendimientos en diferentes cultivos, principalmente en cereales. Los resultados obtenidos, especialmente con la inoculación de *Azotobacter chroococcum* y *Azospirillum brasilense*, no deben atribuirse exclusivamente a la ganancia de N₂ por las plantas, ya que estos microorganismos en determinadas condiciones también producen un efecto beneficioso debido fundamentalmente a su capacidad de solubilizar fosfatos y sintetizar sustancias estimuladoras del crecimiento vegetal tales como vitaminas y hormonas vegetales que intervienen directamente sobre el desarrollo de las plantas (Burdman, 2000; Itzigsohn, 2000; Rodelas, 2001). En el caso específico de *A. chroococcum* se demostró que puede sintetizar tiamina, ácido nicotínico, ácido pantoténico, biotina, ácido indolacético

(AIA), ácido giberélico y citoquininas (Rodelas, 2001).

Adicionalmente, *Azotobacter* sp. es capaz de sintetizar sustancias fungistáticas que, al inhibir el crecimiento de los hongos fitopatógenos del suelo, promueven indirectamente el desarrollo de las plantas, en especial en las etapas tempranas del cultivo. Estos compuestos tienen acción sobre hongos pertenecientes a los géneros *Fusarium*, *Alternaria*, *Penicillium* y *Rhizoctonia*, variando su acción antagónica con la cepa bacteriana utilizada (Mayea et ál., 1998; Rodelas, 2001). Mediante su acción conjunta, estas sustancias son capaces de estimular la germinación de las semillas y acelerar el crecimiento de las plantas siempre y cuando sea adecuada la concentración de organismos en la rizosfera de las plantas (Kennedy et ál., 2004).

Los suelos en donde se llevaron a cabo estos ensayos son utilizados intensivamente para la práctica agrícola y se caracterizan por presentar un contenido de materia orgánica muy bajo, razón por la cual son pobres nutricionalmente. Esta disminución de la materia orgánica incide en la estabilidad estructural del suelo, haciéndolo más susceptible a la erosión y menos eficiente para la nutrición de las plantas de arroz, debido a su pobreza biológica (Fedearroz, 2000). De tal manera que el buen resultado obtenido con la aplicación de las sustancias húmicas era de esperarse, ya que sus propiedades químicas favorecen cambios estructurales en el suelo ocasionando grandes beneficios para la nutrición de los cultivos (Visser, 1985). Adicionalmente, pueden formar complejos con determinados cationes como hierro, manganeso, zinc, entre otros; característica que también favorece a las plantas dado que ellas tienen la capacidad de absorber dichas sustancias y con ello influir directamente en la toma de micronutrientes (Giner y Arciniega, 2004).

Conclusiones

Se logró la producción de biomasa de la cepa BFN 25 a concentraciones del orden de

10^{10} UFC/mL en 18 horas de fermentación, y con este ingrediente activo se desarrolló una nueva formulación de productos biológicos. Los seguimientos de viabilidad de estos formulados permitieron mostrar que algunos de ellos, además de aumentar la estabilidad en almacenamiento, mostraron buenos resultados de producción en campo. Las actividades específicas demostradas para este microorganismo sugieren que a futuro estos biofertilizantes pueden ser una alternativa, no solo para obtener beneficios económicos en el cultivo sino para permitir que se maneje una agricultura ambientalmente más sana y productiva.

Agradecimientos

Este trabajo fue realizado gracias a la colaboración de la Universidad Nacional de Colombia, del Posgrado Interfacultades de Microbiología (UNAL), del personal del laboratorio de fermentaciones del Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional de Colombia (IBUN), y de la empresa Biocultivos S.A.

Referencias bibliográficas

- Balows, A.; Hans, G.; Truper, M. D.; Wim, H.; Karl-Heinz, S. 1992. The Prokaryotes. Second edition. Springer-Verlag.
- Brauer, H. 1987. Development and efficiency of a new generation of bioreactors, Part I. Bioprocess Eng. pp. 149-159.
- Burges, H. 1998. Formulation of Microbial Biopesticides. En: Beneficial microorganism, nematodes and seed treatments. Great Britain: Kluwer Academic Publishers.
- Burdman, S.; Hamaoui, B.; Okon, Y. 2000. Improvement of legume crop yields by co-inoculation with *Azospirillum* and *Rhizobium*. The Otto Warburg Center for Agricultural Biotechnology. Israel: The Hebrew University of Jerusalem.
- Castilla, L. 2000. Factores que afectan la eficiencia de la fertilización en el cultivo de arroz. Fundamentos teóricos de los fertilizantes y la fertilización en el cultivo de arroz. Ibagué: Fedearroz, Fondo Nacional del Arroz.
- Cattelan, J.; Hartel, P.; Fuhrman, J. 1999. Screening for plant growth-promoting Rhizobacteria to promote

- early soybean growth. *Soil Science Society American Journal* 63: 1670-1680.
- Chen, Y. P.; Rekha, P. D.; Arun, A. B.; Shen, F. T. 2006. Phosphate solubilizing bacteria from subtropical soil and their tricalcium phosphate solubilizing abilities. *Applied Soil Ecology* 34: 33-41.
- Degiovanni, V.; Lai, W.-A.; Rivera, B.; Aristizábal, D. 1989. Curso de arroz, sección CNI Turipaná. Colombia: Instituto Colombiano Agropecuario (ICA).
- Dobereiner, J. 1997. Biological nitrogen fixation in the tropics: Social and economic contributions. *Soil Biol Biochem* 29: 771-774.
- Echeverri, R.; Castilla, A. 2008. Biofertilizantes como mejoradores del proceso de nutrición del arroz. *Revista Arroz* 56 (474), 12-27.
- Fedearroz. 2000. Manejo y conservación de suelos para la producción de arroz en Colombia. Bogotá: Fondo Nacional del Arroz.
- Giner, J.; Arciniegas, L. 2004. Las sustancias húmicas: incidencia en la fertilidad de los cultivos. *Revista Agrícola Vergel* 269, 264-269.
- González, J.; Llunch, C. 1992. *Biología del nitrógeno. Interacción planta-microorganismo*. Ed Madrid: Rueda.
- Hernández-Apaolaza, L. 1997. Determinación de quelatos férricos de uso agrícola. Aplicación al estudio de su adsorción por materiales edáficos. Tesis Doctoral Universidad Autónoma de Madrid.
- Higa, T.; Parr, J. 1994. Beneficial and effective microorganisms for a sustainable agriculture and environment. Japan: International Nature Farming Research Center.
- Illmer, P.; Schinner, F. 1992. Solubilization of inorganic phosphates by microorganisms isolated from forest soil. *Soil Biol Biochem*, 24: 389-95.
- Itzigsohn, R.; Burdman, S.; Okon, Y. 2000. Plant growth promotion in natural pastures by inoculation with *Azospirillum brasilense* under suboptimal growth conditions. *Arid Soil research and Rehabilitation* 113, 151-158.
- Kennedy, I.; Choudhury, A.; Kecske's, M. 2004. Non-symbiotic bacterial diazotrophs in crop-farming systems: can their potential for plant growth promotion be better exploited? *Soil Biology & Biochemistry* 36, 1229-1244.
- Kibbe, A. 2000. *Handbook of Pharmaceutical excipients*. Third edition. Washington DC. London, United Kingdom: American Pharmaceutical Association (APhA).
- Lozano, A. 1998. Determinación de actividad de nitrógenasas en cultivos de microorganismos diazotrofos. (Guía) Universidad Nacional de Colombia, Facultad de Ciencias, Departamento de Química.
- Mayea, S.; Carome, M.; Novo, R.; Boado, I.; Silverira, E.; Soria, M.; Morales, Y.; Valiño A. 1998. *Microbiología Agropecuaria*. Tomo II. La Habana: Ed. Félix Varela.
- Moreno, N.; Buitrago, G. 2003. Memorias del Curso taller "Uso y aplicación de insumos agrícolas de origen biológico", dictado para los instructores del SENA. Centro Múltiple El Espinal - Sena Regional Tolima.
- Moreno, N.; Montoya, D.; Valencia, H.; Sánchez, J.; Sarmiento, G. 2004. Informe técnico final del proyecto "Aislamiento y selección de microorganismos promotores de crecimiento vegetal y producción de biofertilizantes para ser aplicados como insumos agrícolas", Financiado por el SENA.
- Rodelas, M. 2001. Interacción *Rhizobium-Azospirillum* y *Rhizobium-Azotobacter*. Efecto sobre la nodulación y fijación simbiótica del dinitrógeno en *Vicia faba*. Disponible en [http:// 193.146.205.198/sefin/Ecological/Rodelas.html](http://193.146.205.198/sefin/Ecological/Rodelas.html)
- Sundara, R.; Sinha, M. 1963. Phosphates dissolving microorganisms in the soil and rhizosphere. *Indian Journal of Agriculture Science* 33, 272-278.
- Torres, G. 2002. Productos biológicos para una agricultura sostenible. *Revista Arroz* 50 (439), 18-20.
- Valero, N. 2003. Potencial biofertilizante de bacterias diazotrofas y solubilizadoras de fosfatos asociadas al cultivo de arroz (*Oryza sativa* L). Tesis de Maestría. Bogotá: Universidad Nacional de Colombia.
- Vásquez, P.; Holguín, G.; Puente, M.; López-Cortés, A.; Bas-han, Y. 2000. Phosphate-solubilizing microorganisms associated with the rhizosphere of mangroves in a semi-arid coastal lagoon. *Biol Fertil Soils* 30, 460-468.
- Vessey, J. 2003. Plant grown promoting rhizobacteria as biofertilizers. *Plant and soil* 255, 571-586.
- Visser, S. 1985. Physiological action of humic substances on microbial cells. *Soil Biol. Biochem* 17, 457-462.