

Estudio de las condiciones nutricionales óptimas para la producción de biofertilizante a partir de Azotobacter.

Autores: Ing. Nelsy Herrera Coello; Ing. Yadira Barceló Martín; Dr. Agustín García Rodríguez.

Centro de Análisis de Procesos. Universidad Central "Marta Abreu" de Las Villas.

Resumen.

En el presente trabajo se realiza un estudio a escala de laboratorio, sobre el comportamiento cinético del crecimiento de una cepa autóctona del género Azotobacter con capacidad para la producción de biofertilizantes, propagada en diferentes medios de cultivo. Se estudia el medio de cultivo Ashby Manitol Fosfato Modificado, obteniéndose un título de $3.73 \cdot 10^9$ UFC \cdot ml⁻¹ en un tiempo de 72 horas de fermentación. El medio de cultivo Dimargon muestra un incremento de la biomasa bacteriana en el tiempo, alcanzando su máximo valor a las 72 horas con un contenido medio de células viables de $3.75 \cdot 10^8$ UF \cdot ml⁻¹. Se pudo comprobar que en sustrato con miel final de caña (MFC) la cepa muestra una alta capacidad de crecimiento y de adaptación a las condiciones del medio. Se obtiene un producto con un título de $6.0 \cdot 10^{10}$ UFC \cdot ml⁻¹ a una concentración de Azúcares Reductores Totales (ART) de 25 g/l. El medio de cultivo propuesto tiene un costo de \$0.0026 por litro, inferior al propuesto en la literatura para el Ashby y el Dimargon, cuyo costo de un litro es de \$0.23 y \$0.09 respectivamente.

Palabras claves: Biofertilizantes, Azotobacter, medios de cultivo.

Study of the good nutritional conditions for the production of biological fertilizer to leave of Azotobacter.

Abstract.

In the current work is made a study to laboratory scale, related with the kinetic behavior of the growth of Azotobacter strain with capacity for the biological fertilizer production, spread in different cultivation means. The means Ashby is studied, being obtained a title of $3.73 \cdot 10^9$ UFC \cdot ml⁻¹ at one time of 72 hours of fermentation. The kinetics of the growth in the means of cultivation Dimargon shows an increment of the bacterial biomass in the time, reaching its maximum value at the 72 hours with a content of viable cells of $3.75 \cdot 10^8$ UFC \cdot ml⁻¹. En substratum with cane final molasses (MFC) the strain shows a high capacity of growth and of adaptation to the conditions of the means. A product is obtained with a title of $6.0 \cdot 10^{10}$ cells \cdot ml⁻¹ in substrate with a concentration of sugars reductors of 25 g/l. The means of culture proposed has a

cost of \$0.0026 for liter, inferior to the one proposed in the literature for the Ashby and the Dimargon whose cost per liter is of \$0.23 and \$0.09 respectively.

Key words: Biofertilizantes, Azotobacter, means of culture.

Introducción.

La utilización de los fertilizantes biológicos en los sistemas productivos es una alternativa viable y sumamente importante para lograr un desarrollo agrícola ecológicamente sostenible, ya que permite una producción a bajo costo, no contamina el ambiente y mantiene la conservación del suelo desde el punto de vista de fertilidad y biodiversidad^{1,6,7,9}.

Las bacterias fijadores de dinitrógeno en forma libre pertenecientes al género Azotobacter han adquirido una notable importancia en los últimos años, debido a su capacidad para producir sustancias fisiológicamente activas capaces de estimular el desarrollo y el rendimiento de las plantas^{1,2,7,10,11}.

Estudios realizados con una cepa del género Azotobacter utilizando un medio de cultivo con diferentes proporciones de miel final y carbonato de calcio se reportan resultados muy favorables en la dinámica del crecimiento en proceso agitado¹.

Teniendo en consideración estos resultados es que nos proponemos en nuestro trabajo realizar un estudio del crecimiento de una cepa autóctona del género Azotobacter con potencialidades para la producción de fertilizantes biológicos nitrogenados.

Método de investigación.

El desarrollo experimental de este trabajo se realizó siguiendo las siguientes etapas:

- a. Desarrollo de la cepa en medio de cultivo de Ashby Manitol Fosfato modificado^{1,2}.
- b. Crecimiento de la cepa en medio de cultivo Dimargon²
- c. Evaluación del crecimiento de la cepa en sustrato con miel final de caña (MFC).

Microorganismos y medios de cultivo.

Microorganismos. Se empleó una cepa autóctona del genero Azotobacter con conocida capacidad para su empleo en la producción de fertilizantes biológicos propagada en condiciones de laboratorio.

Medios de cultivo. Para la conservación de la cepa se empleó el medio de cultivo de Ashby Manitol Fosfato Agar^{1,2}.

La cepa se desarrollo en medio de cultivo de Asbby Manitol Fosfato Modificado con la adición de sacarosa, lo que se tomó como criterio para evaluar el crecimiento de la cepa en Miel Final de Caña (MFC). Para la inoculación del medio de cultivo Dimargon se utilizó un preinoculo con la cepa crecida en medio de cultivo Ashby, en una proporción de 5 % con relación al volumen total del sustrato a fermentar. Al finalizar la fermentación se determinó el número de células viables y el consumo de azúcares reductores en el sustrato.^{3,4,7}

Evaluación del crecimiento de la cepa en sustrato con miel final de caña (MFC). Para el estudio en zaranda de la cinética del crecimiento de la cepa estudiada se empleó un sustrato conformado por Miel Final de Caña (MFC), a la concentración de Azúcares Reductores Totales (ART) de 15 y 20 g/l, extracto de levadura para garantizar la fuente de nitrógeno y carbonato de calcio. Se ajustó el pH a valores de 5 y 7, según los requerimientos del experimento y temperatura de 32 y 37⁰C, mediante un diseño de experimento 2³. El crecimiento del cultivo se midió mediante la determinación del número de células viables, transcurrido el tiempo de fermentación que fue de 96 horas⁸.

Se utilizo el programa computacional STATGRAPHICS Plus versión 4.1 para el tratamiento de los resultados.

Estudio cinético del proceso en sustratos con miel final de caña (MFC) en volumen de 1.5 litros.

Teniendo en consideración que el extracto de levadura es un producto de alto costo económico, se estudio la posibilidad de sustituir la fuente de nitrógeno por levadura torula, para lo cual se tomo como referencia el Instructivo de MINAZ para la producción del fertilizante fosforina⁵.

Los parámetros de esta etapa fueron:

- Experimento No1: Parámetros: ART: 15 g/ L, Temperatura: 32 °C, pH: 7.0
- Experimento No 2: Parámetros: ART: 20 g/ L, Temperatura: 32 °C, pH: 7.0

Los experimentos se realizaron en un cultivo a batch durante un período de 72 a 96 horas. El flujo de aire fue de 150 L/min. Cada 24 horas se midió el crecimiento de la cepa y el consumo de Azúcares Reductores Totales (ART) en el medio de fermentación.

Experiencias realizadas en sustratos con miel final de caña (MFC) a la concentración de Azúcares Reductores Totales (ART) de 25 g/ l.

El objetivo de este experimento es estudiar la influencia de la concentración de azúcares reductores en el crecimiento de la cepa estudiada. Se procedió de la forma descrita anteriormente.

Análisis de los resultados.

Como se puede apreciar en la Tabla 1 se alcanza un título de 10^9 células * mL⁻¹ a las 72 horas de fermentación. El valor medio es de $3.73 * 10^9$ células * mL⁻¹, resultados similares han sido reportados por otros autores².

Tabla I. Crecimiento de la cepa en medio de cultivo de Ashby Manitol Fosfato Modificado. Tiempo de fermentación: 72 horas. Temperatura: 32°C.

| Exp. | UFC/ml | Exp. | UFC/ml |
|--|--------------|------|---------------|
| I | $4.1 * 10^9$ | VI | $3.25 * 10^9$ |
| II | $4.3 * 10^9$ | VII | $3.00 * 10^9$ |
| III | $1.8 * 10^9$ | VIII | $1.22 * 10^9$ |
| IV | $4.6 * 10^9$ | IX | $2.85 * 10^9$ |
| V | $5.0 * 10^9$ | X | $5.40 * 10^9$ |
| Valor medio: $3.73 * 10^9$ | | | |

Las experiencias en medio de cultivo Dimargon muestran un contenido de células viables que alcanza un valor medio de $3.75 * 10^8$ UFC * ml⁻¹. En la literatura se reporta un contenido de células viables de 10^{11} UFC * ml⁻¹ como máximo valor posible que se puede alcanzar en este género bacteriano. La conversión de sustrato es de 73 %, valor muy cercano al reportado en la literatura para bacterias del género Azotobacter² (Tabla 2).

Tabla 2. Resultados de las experiencias en medio de cultivo Dimargon.

ART_{inicial}: 15.40 g/l. Temperatura: 32°C. Tiempo: 72 horas.

| Experimento | UFC/ml | ART _{residuales} | % Conv. |
|--------------------|---------------------------------|---------------------------|-----------|
| I | $3.60 * 10^8$ | 5.00 | 67 |
| II | $3.80 * 10^8$ | 3.40 | 78 |
| III | $3.60 * 10^8$ | 4.00 | 74 |
| IV | $4.00 * 10^8$ | 4.00 | 74 |
| Valor medio | $3.75 * 10^8$ | 4.10 | 73 |

Estudios realizados por otros autores¹ recomiendan un medio de cultivo formulado a base de Miel Final de Caña (MFC), levadura torula y carbonato de calcio, con muy buenos resultados en el crecimiento de la bacteria Azotobacter¹.

Se estudió la influencia que ejercen los Azúcares Reductores Totales (x_1), la temperatura de operación (x_2) y el pH (x_3) sobre el crecimiento celular, medido como células viables en el cultivo. (UFC * ml⁻¹).

El modelo matemático resulto adecuado para un intervalo de confianza de 95%.

$$\text{UFC/ mL} = - 4.763 * 10^{11} + 3.706 * 10^{10} * x_1 + 2.479 * 10^9 * x_2 + 4.934 * 10^{10} * x_3 - 3.617 * x_1 * x_2 - 3.666 * 10^9 * x_1 * x_3 + 2.867 * 10^8 * x_2 * x_3$$

La temperatura de operación, el pH y el contenido de azúcares reductores en el medio influyen de forma significativa en el crecimiento celular, así como la interacción de la variable azúcares reductores y el pH influye en la calidad del producto como se puede observar en el análisis de los resultados obtenidos en los experimentos.

El estudio cinético del proceso en sustrato con Miel Final de Caña (MFC) se alcanza un valor de $3.7 * 10^8$ UFC* ml⁻¹ y de $3.4 * 10^8$ UFC* ml⁻¹ a la concentración de 15 y 20 g/l de Azúcares Reductores Totales (ART) en un tiempo de 48 y 72 horas respectivamente. (Tabla 3 y 4).

Tabla 3: Resultados de las experiencias realizadas con sustrato con Miel Final de Caña (MFC). Volumen de trabajo: 1.5 litros. Parámetros: ART: 15 g/ L; Temperatura: 32°C; pH: 7.0

| Tiempo (h) | ART (g/ L) | UFC/ mL | % Conv. |
|------------|-------------|---------------|---------|
| 0 | 15.2 | $1.60 * 10^5$ | 0 |
| 24 | 13 | $2.80 * 10^7$ | 14.5 |
| 48 | 12.8 | $3.70 * 10^8$ | 16 |

Tabla 4: Resultados de las experiencias realizadas en sustrato con Miel Final de Caña (MFC). Volumen de trabajo: 1.5 litros. Parámetros: ART: 20 g/L; Temperatura: 32°C; pH: 7.0

| Tiempo (h) | ART (g/ L) | UFC/ mL | % Conv. |
|------------|------------|---------------|---------|
| 0 | 20 | $1.70 * 10^5$ | 0 |
| 24 | 19.2 | $3.40 * 10^5$ | 4 |
| 48 | 15.2 | $1.20 * 10^8$ | 24 |
| 72 | 10.8 | $3.40 * 10^8$ | 46 |

Con el objetivo de conocer la respuesta de la cepa a un incremento del contenido de azúcares reductores en el medio se realizó un estudio a la concentración de 25 g/l, temperatura: 32°C y pH 7.0. Estos resultados se muestran en la Tabla 5.

Tabla 5. Resultados del estudio con Miel Final de Caña (MFC).

Parámetros: ART: 25 g/l, Temperatura: 32°C, pH: 7.0

| Experimento | UFC/ml | ART _{residual} (g/L) | Conversión de sustrato (%) |
|-------------|---------------------|-------------------------------|----------------------------|
| 1 | $5.3 \cdot 10^{10}$ | 8.60 | 66 |
| 2 | $6.0 \cdot 10^{10}$ | 4.80 | 80 |
| 3 | $6.7 \cdot 10^{10}$ | 3.80 | 85 |
| Valor medio | $6.0 \cdot 10^{10}$ | 5.73 | 77 |

Se alcanza un nivel de $6.0 \cdot 10^{10}$ UFC/ml de células viables, muy superior al alcanzado en los medios de cultivo Ashby Manitol Fosfato Modificado y Dimargon, recomendados en la literatura para la propagación de bacterias del género *Azotobacter*².

Por otra parte el medio de cultivo propuesto formulado con Miel Final de Caña (MFC), levadura torula industrial y carbonato de calcio constituye una alternativa para la propagación de bacterias del género *Azotobacter* en la producción de fertilizantes biológicos. Tiene un costo de \$ 0.0026/ litro, inferior al costo del medio de cultivo Ashby y Dimargon formulados con fuentes nacionales y sales minerales de grado técnico cuyo costo de un litro es de \$0.23 y \$ 0.09 respectiva.

Conclusiones.

- 1.- El medio de cultivo Ashby Manitol Fosfato Modificado con la adición de sacarosa, como fuentes de carbono, contiene los requerimientos nutritivos necesarios que permitan obtener una elevada biomasa bacteriana. Se logra obtener un producto con títulos de $3.73 \cdot 10^9$ UFC * ml⁻¹ en 72 horas en pruebas en zaranda y cultivo a batch.
- 2.- El crecimiento de la cepa *Azotobacter* en medio de cultivo Dimargon alcanza un contenido de $3.75 \cdot 10^8$ UFC * ml⁻¹, con una buena utilización del sustrato, lo que demuestra la capacidad de la cepa para incrementar su biomasa bacteriana en presencia de sacarosa, como principal componente de las mieles finales de caña.
- 3.- El medio de cultivo con Miel Final de Caña (MFC) y extracto de levadura, producto que puede ser sustituido por levadura torula industrial constituye una alternativa para la propagación de bacterias del género *Azotobacter* en la producción de fertilizantes biológicos. Se obtiene un producto con una elevada concentración celular. Se logra un título de $6.0 \cdot 10^{10}$ UFC*ml⁻¹, a la concentración de Azúcares Reductores Totales (ART) de 25 g/l, resultados muy superiores a los obtenidos con los medios de cultivo Ashby y Dimargon. El medio de cultivo propuesto tiene un

costo de \$0.0026 (MLC) el litro, inferior al de estos últimos cuyo costo es de \$ 0.23 y \$ 0.09 respectivamente.

Bibliografía.

1. Cupull S. R. Medio de cultivo y Metodología para la producción de Azotobacter. Noveno Forum Provincial de Ciencia y Técnica. Villa Clara. Cuba. 1996.
2. Dibut, B. y otros. Dimargon, nuevo medio de cultivo para la producción industrial de biopreparados a base de Azotobacter chroococcum. Revista INCA. Cultivos Tropicales, 15 No 1, 1994.
3. Herrera, A. "Manual de Prácticas de Laboratorio de microbiología Industrial". Facultad de Biología. Universidad de La Habana. Ministerio de Educación Superior, 1975.
4. Instructivo Provincial para la producción y aplicación de fosforina en cultivos agrícolas. MINAZ, 1992
5. Manual analítico de control unificado para la producción de azúcar crudo. Ministerio de la Industria Azucarera. Tomo 2. 1981.
6. Martínez D. E. Residuos verdes Ciudad terrazas. Instituto Superior Politécnico "José Antonio Echeverría" (ISPJAE), La Habana, Cuba. 1995.
7. Norma cubana. 74 – 38. 1986. "Determinación del total de microorganismos aerobios mesófilos viables". 1986.
8. Pérez N, C. y otros. Apuntes sobre microbiología y Agricultura sostenible. Universidad Central de Las Villas. Centro de Investigaciones Agropecuarias, Santa Clara, Cuba. 1995
9. Resultados finales de ensayos en agricultura de alta precisión". Campaña 2001 – 2002. Informe técnico. Santa Fe./ www. El sitio agrícola. com. Argentina.
10. Rodelas, María Belén. 2001. Interacción Rhizobium-Azospirillum y Rhizobium-Azotobacter. Efecto sobre la nodulación y fijación simbiótica del dinitrógeno en Vicia faba. En: (<http://193.146.205.198/sefin/Ecologia/Rodelas.html>).
11. Subba R. N. "Biofertilizer in Agriculture". Nueva Dehli: IBH. Publicado 1982.

