

**MODELO FACTORIAL PARA EL CONTROL DE CALIDAD DE BIOFERTILIZANTES DE
IMPORTANCIA AGRÍCOLA**



EDGAR JAIRO GONZALEZ INFANTE

FUNDACIÓN UNIVERSITARIA LOS LIBERTADORES

FACULTAD DE CIENCIAS

ESPECIALIZACIÓN EN ESTADÍSTICA APLICADA

BOGOTÁ, D. C.

2017

**MODELO FACTORIAL PARA EL CONTROL DE CALIDAD DE BIOFERTILIZANTES DE
IMPORTANCIA AGRÍCOLA**



**FUNDACIÓN UNIVERSITARIA LOS LIBERTADORES
ESPECIALIZACIÓN EN ESTADÍSTICA APLICADA
BOGOTÁ, D. C. 2017**

Nota de aceptación



Firma del presidente del jurado

Firma del jurado

Firma del Jurado

Bogotá (10, Junio, 2017)

DEDICATORIA:

A mis padres Clara y Nelson, a mis hermanos Camilo y Lina, por su amor incondicional, combustible que me impulsa a hacer realidad mis sueños.



AGRADECIMIENTOS:

-A la Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria (CORPOICA) lugar donde se llevó a cabo este trabajo.

-A Colciencias y el programa de jóvenes investigadores e innovadores (2015) por financiar mi trabajo en la Corporación.

-A la doctora Ruth Bonilla y el grupo de microbiología agrícola, investigadores y asistentes de laboratorio por brindarme las herramientas para realizar este trabajo.

-A mi asesora la profesora Martha Tatiana Jiménez por su apoyo y guía durante la realización de la tesis.

-A todos los compañeros del posgrado.

-A la fundación Universitaria los libertadores por el conocimiento transmitido.

-A mis padres y hermanos, por su amor.



TABLA DE CONTENIDO

1. RESUMEN	7
2. INTRODUCCIÓN	8
3. OBJETIVOS	9
3.1. Objetivo General	9
3.2. Objetivos específicos	9
JUSTIFICACIÓN	10
4. MARCO DE REFERENCIA	11
4.1 <i>Azospirillum</i> y su uso como biofertilizante en Colombia	11
4.2 Formulaciones con <i>Azospirillum</i>	11
4.3 Modelos factoriales en microbiología agrícola	13
5. MARCO TEÒRICO	14
5.1 Bacterias promotoras de crecimiento vegetal	14
5.2 <i>Azospirillum brasilense</i>	15
5.3 Biofertilizante	16
5.4 Modelos factoriales	17
5.5 Modelo factorial del experimento	18
6 MATERIALES Y METODOS	20
6.1 Producción de las formulaciones	21
6.1.1 Microorganismo y condiciones de cultivo	21
6.1.2 Formulaciones líquidas	20
6.1.3 Formulaciones sólidas	21
6.2 Variables respuesta	22
6.2.1 Conteos por unidades formadoras de colonias	22
6.2.2 Producción de indoles	22
6.3 Diseño experimental	23
7. RESULTADOS Y ANÁLISIS	24
8. CONCLUSIONES	33
9. BIBLIOGRAFIA	34

1. RESUMEN:

Se propuso un modelo factorial que integró las variables más influyentes en el control de calidad de biofertilizantes (temperatura y tipo de formulación). Se compararon tres formulaciones con la bacteria promotora de crecimiento en plantas *Azospirillum sp* D7. La primera con una matriz líquida (medio de cultivo), la segunda líquida con la adición de carragenina (2%) y la tercera una formulación de tipo sólido usando la técnica de encapsulación bacteriana en alginato (1,4%). El objetivo del estudio fue ver como la viabilidad bacteriana se ve afectada por este factor y las temperaturas de almacenamiento (Temperaturas: 4 °c, 25 °c y 60 °c). Como resultado se obtuvo que la temperatura y el tiempo de almacenamiento tienen un efecto significativo sobre la viabilidad celular tanto en la población bacteriana como en la producción de indoles. La formulación que mantuvo la población más estable durante el tiempo fue la sólida encapsulada con alginato, mientras la que menos lo hizo fue la líquida sin aditivo, la misma tendencia se vio en la producción de indoles, el modelo propuesto puede ser útil para la evaluación de diferentes bacterias y la evaluación de diferentes factores.

Palabras clave: Biofertilizantes, calidad, formulación, industrial, modelo estadístico.



2. INTRODUCCIÓN:

La degradación de los suelos es un problema de escala mundial, el uso excesivo de fertilizantes químicos en la producción agrícola y el cambio climático están generando daños que podrían ser irreversibles para los ecosistemas (Ruiz y Febles, 2004) (Plasentis, 2006) (Mogollón *et al* 2014). Por esta razón, muchas investigaciones se han enfocado al uso de microorganismos promotores de crecimiento vegetal (PGBP's, por sus siglas en inglés), los cuales tienen la capacidad de sustituir a las enmiendas químicas, mitigando la degradación de los suelos y ayudando a las plantas a lidiar con el estrés producido por el cambio climático. El resultado de casi de un siglo de investigación con estas bacterias, ha generado diversas formulaciones que han sido probadas en una amplia gama de cultivos, al igual que en la reforestación de áreas degradadas en todas las latitudes del mundo. Los avances en la producción de biofertilizantes se están dando a un ritmo cada vez más acelerado, por lo que el control de calidad de las nuevas formulaciones es fundamental.

El laboratorio de microbiología de suelos de la Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria (Corpoica) produce formulaciones de biofertilizantes que después de ser validadas se convierten en bioproductos comerciales. El tiempo de vida en almacenamiento y la temperatura son factores que condicionan la calidad del producto ya que las poblaciones de las bacterias tienden a disminuir bajo la influencia de estos. Las mejoras en estos formulados se han dado gracias al uso de matrices o compuestos que permiten aumentar la vida útil de estos productos.

Los modelos factoriales permiten ejercer control sobre este tipo de variables, por lo que han sido usados ampliamente en la microbiología predictiva de alimentos para describir matemáticamente el crecimiento, sobrevivencia y muerte de microorganismos y evaluar la respuesta microbiana bajo las combinación de factores como las temperatura el pH, el contenido de nutrientes, la humedad relativa y la actividad de agua (Cáceres y Reyna 2009). Sin embargo la aplicación de estos modelos al control de calidad en biofertilizantes es limitada, teniendo en cuenta esto el objetivo de esta investigación fue comparar tres tipos de formulaciones por medio de un modelo factorial que permita aumentar la calidad en el proceso de producción de biofertilizantes.

3. OBJETIVOS:

3.1 OBJETIVO GENERAL:

Comparar tres tipos formulaciones de biofertilizantes por medio de un modelo factorial 3^2 .

3.2 OBJETIVOS ESPECIFICOS:

Evaluar el efecto de los factores temperatura y tipo de formulación en el cambio en el tamaño de la población bacteriana a través del tiempo.

Evaluar el efecto de los factores temperatura y formulación en la producción de índoles a través del tiempo.

Validar estadísticamente el modelo factorial.



JUSTIFICACION:

La formulación de biofertilizantes es un proceso que puede estar afectado por un gran número de factores sometidos a una variabilidad (por ejemplo: las temperaturas de almacenamiento, la tasa de crecimiento bacteriano, las características de la matriz polimérica, la tasa de degradación del compuesto activo, la contaminación en los ensayos de laboratorio, las variaciones en la concentración de los compuestos químicos utilizados y un número n de variables). Estos factores tienen incidencia en el proceso y generan una variabilidad en las características del producto, por lo cual es necesario implementar técnicas estadísticas de control con el fin de estandarizar el proceso y producir biofertilizantes de alta calidad que respondan a las necesidades de la agricultura en el país.

Los modelos factoriales son una herramienta que permite evaluar condiciones que producen variaciones en el proceso y suministrar información para tomar decisiones. La producción de biofertilizantes es fundamental para el desarrollo de la agricultura a nivel mundial, la calidad de estas formulaciones debe ser elevada y tener estándares de calidad y detalles técnicos de producción bien definidos. Un proceso industrial está sometido a una serie de factores de carácter aleatorio que hacen imposible fabricar dos productos exactamente iguales. Dicho de otra manera, las características del producto fabricado no son uniformes y presentan una variabilidad. Esta variabilidad es claramente indeseable y el objetivo ha de ser reducirla lo más posible o al menos mantenerla dentro de unos límites.

1. MARCO REFERENCIA:

4.1 *Azospirillum* y su uso como biofertilizante en Colombia:

El género *Azospirillum* ha sido probado con éxito en todo tipo de cultivos de interés agronómico en Colombia. Por ejemplo, la inoculación de semillas de arroz aumentó el enraizamiento, crecimiento y desarrollo de las plantas (Lara y Álvarez, 2013), en tomate la inoculación generó aumentos significativos en la longitud, peso seco, área foliar, el rendimiento y en la producción de frutos (Sánchez et al, 2010), en pasto guinea (*Panicum máximum*) ha mostrado buenos resultados tanto en invernadero como en campo (Hernández et al, 1997) promoviendo también la germinación y generando aumentos de hasta 26,80% en proteína cruda, y 45,67% en materia seca foliar comparada con las plantas tratadas con 100% de fertilización nitrogenada (Cárdenas et al 2010, 2014). En otras gramíneas ha mostrado aumentos significativos en los rendimientos de grano y en la incorporación total de N; esta cepa puede mejorar la asimilación de fertilizantes, ya sea por los cambios en la estructura de la raíz o por la ayuda de la enzima bacteriana nitrato reductasa (James, 2000).

4.2 Formulaciones con *Azospirillum sp*:

La mayoría de formulaciones de *Azospirillum* son de tipo líquido usando medios enriquecidos con nutrientes para aumentar la biomasa de la bacteria en periodos menores a 24 horas. Debido a esto y a la baja eficiencia en los experimentos en campo en Colombia hay pocos registros ante el ICA formulaciones de tipo líquido y sólido y en todas estas las bacterias están mezcladas con otras cepas lo que dificulta el control de calidad y la evaluación periódica de las poblaciones bacterianas (Tabla 1).

Biofertilizantes de <i>Azospirillum sp.</i> con registro ICA				
Formulación	Nombre	País de origen	Principio activo	Planta
Líquida (Suspensión concentrada)	DIMAZOS SC	COLOMBIA	<i>Azotobacter chroococcum</i> & <i>Azospirillum sp</i>	Arroz, maíz, pastos, caña de azúcar
Líquida (Suspensión concentrada)	OROSUELO SC	COLOMBIA	<i>Azospirillum brasilense</i> , <i>Azotobacter chroococcum</i> ,	Arroz

			<i>Lactobacillus acidophilus, Saccharomyces cerevisiae.</i>	
Líquida (Suspensión concentrada)	DIGESTOR	COLOMBIA	<i>Azospirillum brasillense, Azotobacter chroococcum, Lactobacillus acidophilus & Saccharomyces cerevisiae</i>	Arroz
Líquida (Suspensión concentrada)	BACTOSOIL	COLOMBIA	<i>Azospirillum brasillense, Azotobacter chroococcum, Lactobacillus acidophilus & Saccharomyces cerevisiae</i>	Arroz
Líquida (Suspensión concentrada)	BACTHON	COLOMBIA	<i>Azospirillum brasillense, Azotobacter chroococcum, Lactobacillus acidophilus & Saccharomyces cerevisiae</i>	Arroz, banano, clavel
Líquida (Suspensión concentrada)	PHOEBUS FLO	ARGENTINA	<i>Azospirillum brasillense & Pseudomonas fluorescens</i>	Cilantro, soja
Sólido (Concentrado soluble)	BIOMERK	ESTADOS UNIDOS	<i>Azospirillum brasillense, Saccharomyces cerevisiae, Pseudomonas fluorescens, Bacillus subtilis</i>	Brócoli en etapa de plantulación.

Tabla 1: Formulaciones comerciales de *Azospirillum* con registro ICA.

El uso de polímeros para formulaciones de *Azospirillum* es limitado, solo existen reportes a escala de laboratorio, con carragenina y alginato se han realizado pruebas de

estabilidad mezclando cultivos líquidos con suspensiones líquidas de los polímeros, estas muestran resultados prometedores en cuanto a la capacidad del polímero para mantener la viabilidad celular, sin embargo las formulaciones no han sido probadas en condiciones de invernadero y campo.

En Colombia no hay reportes del uso de matrices de alginato con la técnica de inmovilización microbiana, sin embargo en otros países se han hecho formulaciones para tomate (Bashan et al 2002, Yabur et al 2007), plantas del desierto (Bashan et al 2012) y trigo (Bacilio et al 2004, El-Komy 2005).

4.3 Modelos factoriales en microbiología:

Rojas-Tapias y colaboradores (2015) usaron un modelo multifactorial completo para la evaluación de agentes protectantes (polímeros) en la viabilidad de *Azotobacter chroococcum*, resultados que fueron fundamentales para el escalamiento comercial de Monibac un fertilizante con registro ICA, el modelo también se ha aplicado para evaluar diferentes factores que determinan condiciones óptimas de fermentación para las cepas de Monibac (Camelo, 2015).

En la producción de biofertilizantes las características más importantes del producto son la viabilidad, la seguridad y la eficiencia del producto (Rivera et al 2014). Las técnicas de preservación de las formulaciones son relativamente caras, sin embargo se ha demostrado que reviste de gran importancia mantener la estabilidad bacteriana en tiempos prolongados. Por esta razón, se ha evaluado la eficiencia de los polímeros para aumentar la viabilidad de biofertilizantes como en el caso de formulaciones líquidas para *Rhizobium* (Rivera et al 2014) sin embargo en este estudio no se evaluó la influencia de la temperatura y tiempo de almacenamiento mediante la ecuación de Arrhenius (Rivera et al 2014).

En general para la aplicación del modelo termodinámico de Arrhenius, los diseños experimentales siguen arreglos factoriales, donde los factores son la temperatura y el tipo de formulación. Los modelos factoriales se usan ampliamente en para el control de calidad en alimentos, los avances en la microbiología predictiva se deben en gran medida gracias a la industria de alimentos (Davey 1993). Este tipo de modelación tuvo su origen hace casi 100 años cuando se demostró el efecto de la temperatura sobre la resistencia al calor de los microorganismos por medio de la ecuación de Arrhenius (Leguérinel y Mafart, 2008). En los años 80, con el desarrollo de la industria de alimentos la microbiología predictiva vistió de gran importancia en la modelación del crecimiento microbiano en los alimentos, análisis y control de riesgo. En alimentos la microbiología predictiva se enfoca en microorganismos patógenos o indicadores de deterioro enfocándose exclusivamente

en la salud humana, logrando predecir la vida útil de los alimentos al almacenarlos en distintas temperaturas.

Otros estudios en biofertilizantes mostraron que la preservación de *A.Chroococcum* C26 utilizando polímeros es una alternativa adecuada para mantener su viabilidad a lo largo del tiempo. El modelo de Arrhenius demostró que las temperaturas y los tiempos de almacenamiento tienen un efecto sobre la viabilidad bacteriana. Un ejemplo es el estudio de Rojas y colaboradores (2015) en donde se comparó la viabilidad celular entre tres polímeros: alginato, carragenina y HPMC (Hidroxipropilmetilcelulosa), los resultados mostraron que el uso de polímeros incrementa la energía de degradación bacteriana comparados con el control, además con el modelo fue posible obtener ecuaciones para cada polímero, para predecir el tiempo de degradación térmica de las células a diferentes temperaturas.

La ecuación también se usó para ver la viabilidad de *E.coli* y *Bacillus subtilis* en matrices de Goma de Acacia y Pululano. Estos polímeros mostraron ser agentes protectantes efectivos durante ante la deshidratación y almacenamiento en diferentes condiciones ambientales. (Krumnow *et al* 2009)

2. MARCO TEÓRICO

5.1 Bacterias promotoras de crecimiento vegetal:

Las PGPB's (por sus siglas en inglés) son un grupo de bacterias de diferentes especies que tienen la capacidad de promover el crecimiento y la productividad de las plantas (de-Bashan *et al* 2007). Las rizobacterias son las más estudiadas, y se definen como microorganismos de vida libre, que colonizan la rizosfera, el rizoplano ó filosfera de las plantas y que bajo ciertas condiciones las benefician incrementando su crecimiento y productividad (Bashan y de-Bashan 2005). Los géneros más conocidos y útiles para la agricultura son: *Azospirillum*, *Rhizobium*, *Pseudomonas*, *Azotobacter*, *Bacillus*, entre otros.

Estas bacterias, pueden afectar positivamente a la planta por medio de mecanismos directos o indirectos (Glick, 1997). Los más importantes son: (Figueiredo *et al* 2011): Aumento de la solubilización de minerales, fijación de nitrógeno, represión de los patógenos del suelo, aumento de la tolerancia al estrés hídrico, resistencia a salinidad y toxicidad de metales o la producción de fitohormonas que promueven la actividad radical como el ácido-3-indol acético (AIA), las giberelinas y las citoquininas.

Cada género tiene características particulares por las cuales benefician a las plantas. Por ejemplo: *Rhizobium* por la fijación de Nitrógeno en leguminosas, *Pseudomonas* por la solubilización de fósforo y producción de antibióticos ó *Bacillus* por su capacidad para degradar materia orgánica. Y todas están reportadas por su capacidad de producir hormonas como auxinas, citocininas y giberelinas (Leyva 2006).

5.2 *Azospirillum brasilense*

Es considerada la bacteria más importante en mejorar significativamente el crecimiento, desarrollo y el rendimiento de ciertas gramíneas forrajeras y otras especies cultivables alrededor del mundo (Cassan y García 2008). Es de particular interés debido a su versatilidad metabólica, capacidad para fijar nitrógeno, producción de fitohormonas, células tipo quistes que le brindan la capacidad de resistir a diferentes tipos de estrés ambiental y a la capacidad de adherirse a diversos sistemas de raíces (Holguín y Bashan 1996), por lo cual se dice que no es una bacteria planta-específica.

Se encuentra clasificada dentro de subclase alfa de las proteobacterias (Young 1992) de la familia Rhodospirillaceae. Las características para su identificación son la forma de bacilo ligeramente curvado (1µm de ancho y 2-3 µm de longitud), el pleomorfismo y su movilidad en espiral mediada por un flagelo polar, células de tipo gram negativo a gram variable (Bergey 1994) que presentan cantidades elevadas de poli-β-hidroxibutirato (PHB), hasta 50% del peso seco celular (Okon e Itzigsohn 1992, Baca et al 2010).

Fue aislada de pastizales en Brasil (de ahí su nombre) en 1979 por Tarrand y colaboradores. Lleva a cabo todas las vías del ciclo del nitrógeno, excepto la nitrificación, fijan N² atmosférico en condiciones tropicales (30-40° C), pueden colonizar los tejidos de las plantas como endófitas facultativas, de maíz, trigo, arroz, sorgo y no gramíneas y están clasificadas dentro de las diazótroficas asociativas (Cassan 2008). Es microaerofílica, tiene un metabolismo oxidativo, y la detección de energía es un comportamiento dominante, la bacteria tratará de llegar a ambientes donde los nutrientes y la concentración de oxígeno le permita mantener niveles de energía óptima y fijación de nitrógeno (Alexandre 2000, Cholula 2008). Presenta pleomorfismo, por lo que cambia sus actividades metabólicas en respuesta a los cambios en el ambiente. En condiciones microaerofílicas presentan movilidad en espiral (Hernández-Ascencio, 2003) lo cual se debe a la presencia de dos tipos de flagelos. 1) un solo flagelo polar que es sintetizado en medio líquido responsable del nado de las bacterias y 2) numerosos flagelos laterales,

además del polar, sintetizados en medios sólidos y semi-líquidos, los cuales sirven para coordinar el movimiento a lo largo de los medios sólidos y semisólidos (Katzy et al 2001).

Cultivada en placas de medio mineral OAB (Okon et al 1977) presenta colonias redondeadas, mucosas y con una pigmentación rosada, el paquete celular obtenido por centrifugación en caldo de cultivo BTB-1 (Bashan et al 2011) tras 18 horas de incubación, es rosado. Crece bien con sales de ácidos orgánicos como malato, succinato, lactato y piruvato. Utiliza algunos monosacáridos como fuente de carbono como la fructosa pero no a disacáridos (Leyva 2006). En medio con malato (semisólido) libre de nitrógeno, las células son principalmente vibroides, incluso cuando el cultivo llega a ser alcalino.

5.3 Biofertilizante:

Es la formulación que contiene una o más cepas bacterianas benéficas (o especies) en un soporte base, fácil de usar y económico, que puede ser inorgánico, orgánico, o sintetizarse de moléculas definidas. Los efectos deseados de la biofertilizantes en el crecimiento de la planta pueden incluir la fijación de nitrógeno en las leguminosas, el biocontrol de patógenos, la absorción de minerales, la intemperización de los minerales del suelo y los efectos nutricionales u hormonales (Bashan 1998). El biofertilizante es el medio de transporte bacteriano desde la fábrica hasta la planta viva. El acarreador es el sustrato abiótico (sólido, líquido o gel) que es usado en el proceso de formulación. El término “formulación” se refiere al proceso industrial o a nivel de laboratorio para unificar el acarreador con la cepa bacteriana (Bashan et al 2014).

De manera general los inoculantes (biofertilizantes) se pueden clasificar de la siguiente manera (Bashan et al 2014).

- 1) Inoculantes primitivos: No tienen una formulación específica, los microorganismos se crecen en un medio de cultivo específico y son aplicados directamente a las plantas.
- 2) Inoculantes líquidos: Son cultivos microbianos o suspensiones a las cuales se les adiciona sustancias que pueden mejorar las propiedades de adherencia, la estabilización, las propiedades tensas activas y las habilidades de dispersión. Las desventajas
- 3) Inoculantes inorgánicos: Se hacen a partir de material inorgánico natural, polímeros naturales o materiales sintéticos.

- 4) Inoculantes orgánicos: Se hacen a partir de materiales orgánicos, el más conocido usado es la turba y ha sido ampliamente usada para la mayoría de inoculantes. En la actualidad se aplica con gran variedad de aditivos en forma sólida (polvo), como pellet o como líquido (suspensión).
- 5) Inoculantes hechos con suelo: Los microorganismos son cultivados en los suelos de sus hábitats, generalmente con algunos aditivos y son aplicados usando como acarreador el suelo.
- 6) Inoculantes poliméricos: Son formulaciones sintéticas basadas en una variedad de polímeros, los principales son: Alginato, agar, carragenina λ y κ , pectina, quitosina, goma de semilla y polímeros de propiedad.

A pesar de su amplio uso, los inoculantes líquidos limitan la vida de anaquel de las formulaciones y requieren temperaturas bajas para su almacenamiento (cita). En los últimos años se ha evaluado el uso de acarreadores poliméricos como la carragenina y el alginato, el alginato aumenta la vida de anaquel posibilitando el almacenamiento a temperatura ambiente por prolongados periodos de tiempo, soporta alta densidad de bacterias (Bashan et al 2014), a pesar de que no existen formulaciones comerciales, estas matrices se perfilan como el futuro de la producción de biofertilizantes.

5.4 Modelos factoriales:

De acuerdo con Kuehl (2001), los arreglos factoriales generan experimentos más eficientes, debido a que cada unidad experimental suministra información sobre todos los factores involucrados en el experimento. Además, se pueden ver las respuestas a un factor para cada uno de los niveles (factor cuantitativo) o modalidades (factor cualitativo) de otro factor.

El arreglo factorial consiste en todas las posibles combinaciones de los niveles en los factores, las que, a su vez, se constituyen en los tratamientos del experimento, el cual puede ser conducido bajo cualquier tipo de diseño experimental, según las características de las unidades experimentales. Esto quiere decir que el arreglo factorial es independiente del diseño experimental que se utilice, tal como lo expresa Martínez (2009): “Los experimentos o arreglos factoriales no constituyen un nuevo tipo de diseño experimental, corresponden, como su nombre lo indica, a una forma particular de combinar un conjunto de tratamientos y no a la forma o procedimiento de cómo se asignan los tratamientos a las unidades experimentales.”

Los diseños factoriales producen experimentos más eficientes, pues cada observación proporciona información sobre todos los factores, y es factible ver las respuestas de un factor en diferentes niveles de otro factor en el mismo experimento. La respuesta a cualquier factor observado en diferentes condiciones indica si los factores actúan en las unidades experimentales de manera independiente. La interacción entre factores ocurre cuando su actuación no es independiente (Kuel, 2001). El diseño factorial consiste en realizar todas las combinaciones posibles de los niveles de varios factores. Con frecuencia, los experimentos con diseños factoriales se conocen como factoriales o experimentos factoriales.

El efecto de un factor es un cambio en la respuesta medida ocasionado por un cambio en el nivel de ese factor, los tres efectos de interés en un experimento factorial son los simples, los principales y los de interacción.

La microbiología predictiva, de gran crecimiento en los últimos años, constituye un enfoque interdisciplinario en el que se conjugan la microbiología, la matemática, la estadística y la tecnología de alimentos, con el objeto de describir, por medio de ecuaciones matemáticas, el comportamiento de los microorganismos frente a combinaciones de condiciones ambientales definidas y controladas (Borrego, sf). De esta capacidad de describir, surge la posibilidad de predecir la respuesta fisiológica de los microorganismos sobre la base de parámetros físico-químicos relevantes.

En la actualidad existen muchos modelos matemáticos que permiten predecir el crecimiento de un amplio rango de microorganismos patógenos y alteradores de alimentos bajo distintas combinaciones de factores ambientales, intrínsecos y extrínsecos. El modelado matemático es realizado, generalmente, asumiendo condiciones constantes para determinar los valores de los parámetros cinéticos de crecimiento (Cayre et al, 2001). Sin embargo, condiciones tales como temperatura, pH o composición de la atmósfera gaseosa no se mantienen constantes durante el almacenamiento (Labuza and Taoukis, 1992). Debido a este hecho, en la actualidad el modelado matemático está orientado a la obtención de modelos dinámicos, es decir, modelos que permitan predecir la seguridad o vida útil de las formulaciones bajo condiciones fluctuantes. Uno de los factores que más fluctúa es la temperatura de almacenamiento y es el más investigado.

5.4.1 Modelo factorial del experimento:

Modelo factorial completo 3^2

FACTORES(2)	NIVELES(3)
Temperatura de almacenamiento	4°C, 25°C,60°C

Tipo de formulación	Líquido, Líquido+polímero, Sólido+polímero
---------------------	---

Modelo:

$$\gamma = \mu + f1(\text{Temperatura}) + f2(\text{formulación}) + f1 * f2 + \varepsilon$$

Donde:

γ = Variable respuesta
 μ = Numero inicial variable respuesta
 $f1$ = Factor 1
 $f2$ = Factor 2
 $f1 * f2$ = Interacción factores
 ε = Error

Supuestos del modelo:

Se deben cumplir los supuestos de normalidad y homogeneidad.

Hipótesis:

- 1- $H_0: f1=0, H_a: f1 \neq 0.$
- 2- $H_0: f2=0, H_a: f2 \neq 0.$
- 3- $H_0: f1*f2=0, H_a: f1*f2 \neq 0.$

Tabla de análisis de varianza:

FV	SC	g.l.	MC	F
Factor 1	SCA	J-1	$\frac{SCA}{J-1}$	$F_A = \frac{MCA}{MCE}$
Factor 2	SCB	K-1	$\frac{SCB}{K-1}$	$F_B = \frac{MCB}{MCE}$
Interacción	SCAB	(J-1)(K-1)	$\frac{SCAB}{(J-1)(K-1)}$	$F_{AB} = \frac{MCAB}{MCE}$
Error	SCE	N-JK	$\frac{SCE}{N-JK}$	

Total	SCT	N-1		
-------	-----	-----	--	--

Donde: Escriba aquí la ecuación.

SCA: Suma cuadrados factor 1
 SCB: Suma cuadrados factor 2
 SCAB: Suma cuadrados factor1*factor2
 SCE: Suma cuadrados del error
 SCT: Suma cuadrados total

MCA: Cuadrado medio factor 1
 MCB: Cuadrado medio factor 2
 MCE: Cuadrado medio del error
 MCAB: Cuadrado medio factor1*factor2
 J y K: Niveles del factor

- $SCT = \sum_{i,j,k} y_{ijk}^2 - (y_{...})^2 / r$: Suma total de cuadrados.
- $SCA = \left(\sum_i y_{i..}^2 \right) / (br) - (y_{...})^2 / (abr)$: S. C. entre niveles de A.
- $SCB = \left(\sum_j y_{.j.}^2 \right) / (ar) - (y_{...})^2 / (abr)$: S. C. entre niveles de B.
- $SC(AB) = \left(\sum_{i,j} y_{ij.}^2 \right) / r - (y_{...})^2 / (abr) - SCA - SCB$: S. C. de la interacción A x B
- $SCR = SCT - SCA - SCB - SC(AB)$: S. C. del error.

A partir de la ecuación básica del ANOVA se pueden construir los cuadrados medios definidos como:

- * Cuadrado medio total: $CMT = (SCT) / (n - 1)$
- * Cuadrado medio de A: $CMA = (SCA) / (a - 1)$
- * Cuadrado medio de B: $CMB = (SCB) / (b - 1)$
- * Cuadrado medio de la interacción A x B: $CM(AB) = (SC(AB)) / ((a - 1)(b - 1))$



3. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1 Producción de las formulaciones

6.1.1 Microorganismo y condiciones de cultivo

Azospirillum sp. D7 se aisló de suelos del altiplano cundiboyacense por el laboratorio de microbiología de suelos de CORPOICA. La cepa se reactivó de almacenamiento a -80°C

por siembra en estría cruzada en cajas Petri con medio de cultivo ABRA, incubando a 30 °c durante 48h.

6.1.2 Formulaciones líquidas:

Para preparar el inóculo, una asada abundante se transfirió a un enfermeyer con 50ml de medio de cultivo, la suspensión se dejó en incubación a 120rpm y 30 °c durante 24h. Este inóculo correspondió a la formulación líquida. Se almacenaron alícuotas de 1ml de acuerdo a los tratamientos planteados.

La siguiente formulación se preparó bajo las mismas condiciones pero adicionando carragenina al cultivo a una concentración final de 1%, para esto 2g de carragenina se disolvieron en una mezcla de 25 ml de glicerol 80% y 25 ml de agua destilada. Esta solución se mezcló en proporción 1:1 con el inóculo para producir la segunda formulación.

6.1.3 Formulación sólida:

A partir del inóculo se aplicó la técnica de inmovilización bacteriana propuesta por de-Bashan y colaboradores (2005). Para esto se preparó una solución alginato de sodio al 1,4% y se mezcló en proporción 80:20 con la bacteria. La mezcla se forzó a pasar a por un abertura de 200µm por medio de un compresor de aire, las microgotas se dejaron caer sobre una solución de CaCl_2 2% (figura), formando capsulas húmedas. Luego del proceso las capsulas fueron secadas a 45°c durante 24 horas, se maceraron y se almacenaron en tubos eppendorf para el ensayo.

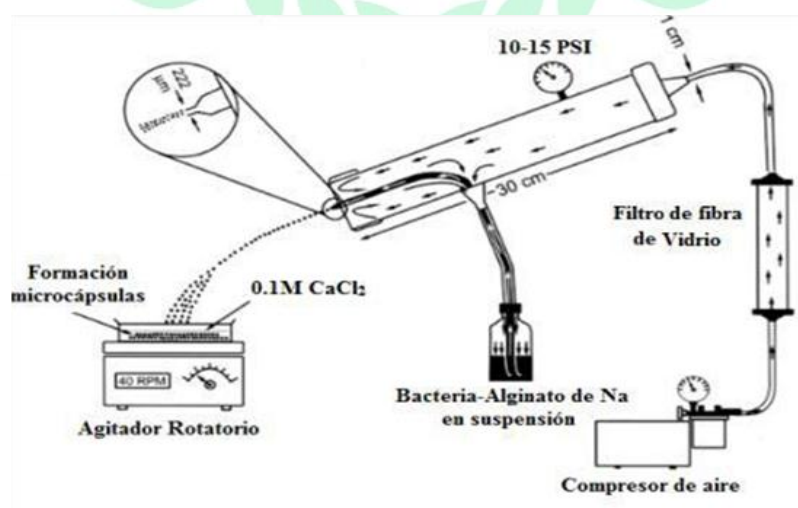


Figura: Equipo para la producción de formulaciones sólidas. Microencapsulador (Bashan et al 2005).

Almacenamiento de las formulaciones:

Las formulaciones líquidas y líquidas más polímeros se dispusieron en tubos eppendorf a un volumen final de 1ml por tubo, para la formulación sólida se pesaron 100mg y se llevaron a los tubos correspondientes a cada tratamiento:

6.2 Variables respuesta:

6.2.1 Conteos por Unidades Formadoras de Colonias (UFC):

Los conteos de las bacterias presentes en las formulaciones se realizaron en el tiempo 0 y en las semanas 0, 2 y 4. De la siguiente manera:

6.2.1.2 Conteos formulaciones líquidas:

A partir de 1ml de cada formulación se realizaron diluciones seriadas en tubos eppendorf de 1.5ml (eppendorf®) para sembrar por microplaca en cajas con agar nutritivo. Las cajas se dejaron en incubación a 35°C durante 48 horas y después de este tiempo se realizaron los conteos de las colonias.

6.2.1.3 Conteos formulación sólida:

Los 100mg de inoculante se disolvieron en 15 de ml de Citrato de Sodio (4%) en tubos falcon® de 50ml. Los tubos se colocaron en una gradilla sobre una plataforma de agitación a 120rpm durante 30 min, la solución se centrifugó a 6000g y el botón celular se resuspendió en 1 ml de NaCl al 0,85%. Se realizaron diluciones seriadas en tubos eppendorf de 1.5ml (eppendorf®) para sembrar por microplaca en cajas con agar nutritivo en placa. Las cajas se dejaron en incubación a 35°C durante 48 horas y después de este tiempo se realizaron los conteos de las colonias.

6.2.2 Producción de indoles:

La producción de indoles se evaluó usando la técnica colorimétrica propuesta por Glickman y Dessaux (1995), con las modificaciones de Cárdenas y colaboradores (2010). Los datos se tomaron en los tiempos: Semana 1, 2, 3 y 4.

El pellet de cada formulación se re suspendió en 1ml de agua destilada, de ahí se tomaron 100µL y se inocularon en medio de cultivo DYGS suplementado con 100mM de

L-triptofano. Después de incubación por 96h a 120rpm y 28°C, se centrifugaron las células a 14000 rpm durante 5 minutos y se tomaron 100 µL del sobrenadante el cual se dejó reaccionando por 30 minutos con el reactivo de Salkowsky en placas de Elisa en oscuridad, pasado este tiempo se realizó la lectura de densidad óptica a una absorbancia de 540nm.

6.4 Diseño del experimento:

Se hizo un diseño completamente al azar con estructura factorial completa 3², teniendo como factores: la temperatura (4°C, 25 °c y 60 °c) y el tipo de formulación (líquida (L), líquido + polímero (L) y sólido (LP) + polímero (SP)). Las combinaciones dieron como resultados 9 tratamientos compuestos de las formulaciones almacenadas en cada temperatura (Tabla 2). Las variables respuestas se analizaron independientemente y fueron los conteos poblaciones reportados en unidades formadoras de colonias y la producción de índoles, las mediciones se hicieron por duplicado para un total de 18 mediciones por variable y por tiempo. Estas se evaluaron semanalmente desde el tiempo 0 hasta la semana 4 por medio de un muestreo destructivo. Los datos se analizaron por medio de un prueba de ANOVA y el post hoc de Tuckey en el software Minitab®.

Tratamientos	Descripción
T1	Líquido 4°C
T2	Líquido 25°C
T3	Líquido 60°C
T4	Líquido + Carragenina 4°C
T5	Líquido + Carragenina 25°C
T6	Líquido + Carragenina 60°C
T7	Sólido + Alginato 4°C
T8	Sólido + Alginato 25°C
T9	Sólido + Alginato 60°C

Tabla 2: Tratamientos planteados para el experimento factorial.

4. RESULTADOS y ANALISIS:

7.1 Censos por unidades formadoras de colonias:

Al analizar los censos poblacionales (UFC) en los tres tiempos (semana 0, semana 2 y semana 4) con un nivel de significancia de 0.05 no se evidenció efecto de los factores temperatura y formulación combinados ($p=0,969$), ni del factor formulación ($p=0,66$), únicamente para el factor temperatura el efecto fue significativo. Estos resultados pueden deberse a que los estudios de estabilidad acelerada requieren muestreos en tiempos mayores a un mes. Por esta razón, se analizaron los tiempos semana 2 y semana 4 por separado, para ver el efecto de los factores en cada uno.

Anova censos poblacionales (UFC)						
Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p	
Modelo	8	774,86	96,857	4,35	0,001	
Lineal	4	762,99	190,748	8,57	0,000	
TEMPERATURA	2	744,34	372,172	16,72	0,000	
FORMULACION	2	18,65	9,323	0,42	0,660	
Interacciones de 2 términos	4	11,87	2,967	0,13	0,969	
TEMPERATURA*FORMULACION	4	11,87	2,967	0,13	0,969	
Error	45	1001,90	22,265			
Total	53	1776,76				

Tabla 3. Análisis de varianza, variable respuesta Unidades Formadoras de colonias (UFC). Tiempo: Semana 0, 2 y 4.

Los censos poblacionales se vieron afectados por los factores (temperatura y formulación) individualmente y en conjunto tanto en la semana 2 (tabla 4) como en la semana 4 (tabla 5).

Anova conteos poblacionales (UFC), semana 2					
Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
Modelo	8	481,020	60,127	3133,51	0,000
Lineal	4	479,226	119,806	6243,65	0,000
Temperatura	2	477,615	238,808	12445,33	0,000
Formulación	2	1,610	0,805	41,96	0,000
Interacciones de 2 términos	4	1,794	0,449	23,37	0,000
Temperatura*Formulación	4	1,794	0,449	23,37	0,000
Error	9	0,173	0,019		
Total	17	481,193			

Tabla 4. Análisis de varianza, variable respuesta: Unidades Formadoras de colonias (UFC). Tiempo: Semana 2.

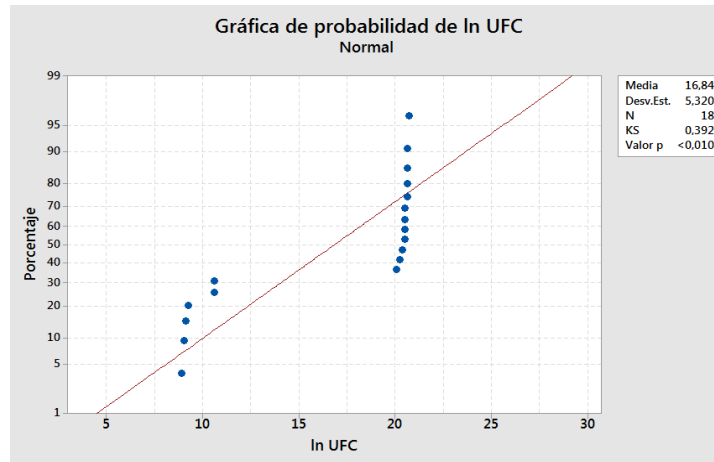
Anova conteos poblacionales (UFC), semana 4					
Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
Modelo	8	786,631	98,329	1041,88	0,000
Lineal	4	764,405	191,101	2024,88	0,000
Temperatura	2	720,077	360,039	3814,92	0,000
Formulación	2	44,328	22,164	234,85	0,000
Interacciones de 2 términos	4	22,225	5,556	58,87	0,000
Temperatura*Formulación	4	22,225	5,556	58,87	0,000
Error	9	0,849	0,094		
Total	17	787,480			

Tabla 5. Análisis de varianza, variable respuesta: Unidades Formadoras de colonias (UFC). Tiempo: Semana 4.

Validación de supuestos del modelo:

Semana 2:

Normalidad:



Como $p < 0.05$, se rechazó la hipótesis nula de normalidad de la población, los datos no son normales.

Homogeneidad de varianzas:

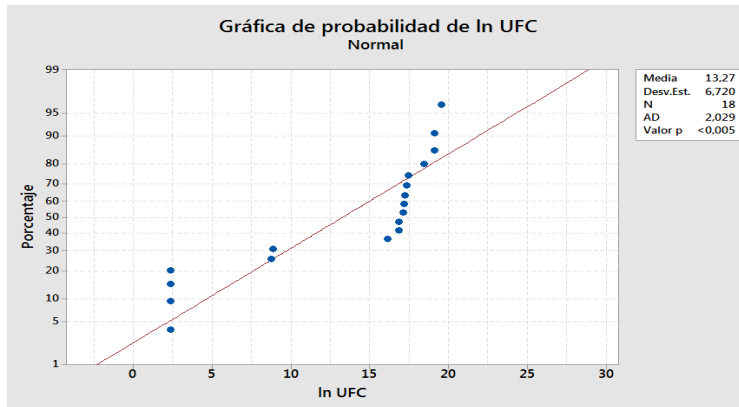
Pruebas

Método	Estadística de prueba	Valor p
Comparaciones múltiples	-	0,838
Levene	*	*

Con una significancia del 0.05. Se cumple el supuesto de homogeneidad de varianza $p > 0.05$. Las varianzas son homogéneas.

Semana 4:

Normalidad:



Como $p < 0.05$, se rechazó la hipótesis nula de normalidad de la población, los datos no son normales.

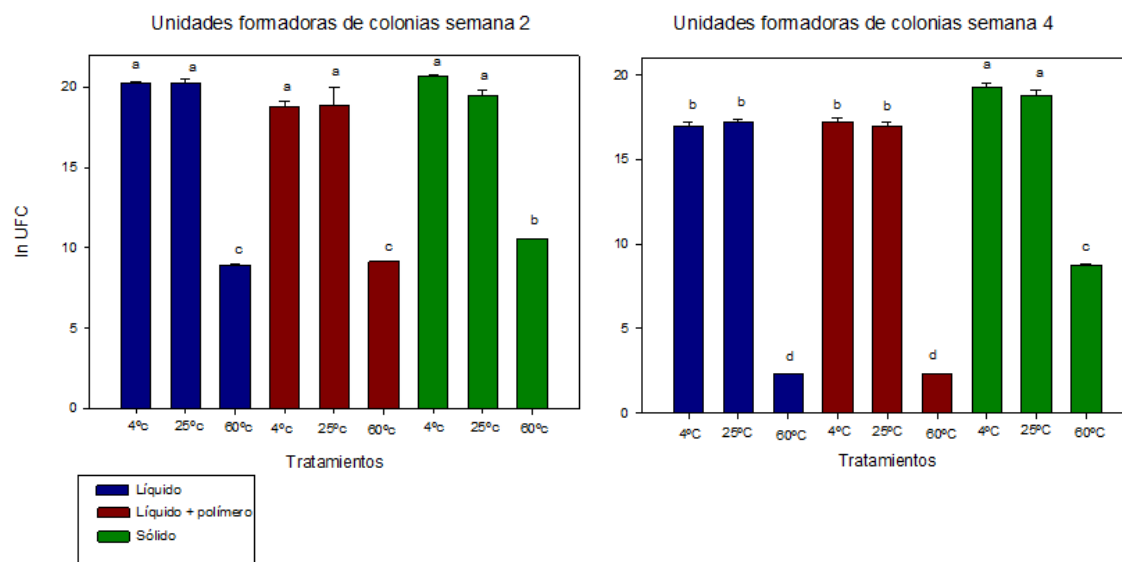
Homogeneidad de varianzas:

Pruebas

Método	Estadística de prueba	Valor p
Comparaciones múltiples	-	0,079
Levene	*	*

Con una significancia del 0.05. Se cumple el supuesto de homogeneidad de varianza $p > 0.05$. Las varianzas son homogéneas.

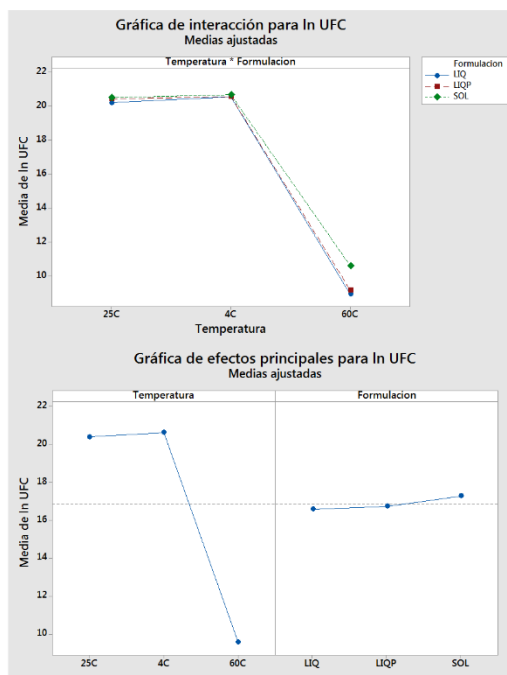
De acuerdo a la prueba de Tuckey los tratamientos con un conteo poblacional medio mayor para la semana 2 fueron: T1 (Líquido +4°C), T2(Líquido+25°C) y T8(Sólido+25 °C), sin embargo al analizar por temperatura solo se observaron diferencias significativas en la temperatura 60 °C de la formulación sólida con respecto a la formulación líquida y líquida +polímero (Gráfica 1). En la semana 4 se observó que todas las formulaciones sólidas (T7, T8 Y T9), tuvieron unos conteos significativamente mayores con respecto a las formulaciones líquidas (Gráfica 1).



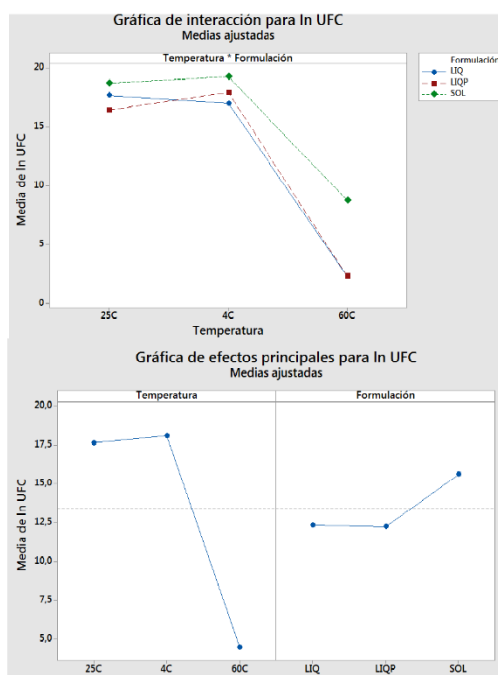
Grafica 1. Unidades formadoras de colonias por tratamiento. Semana 2 y semana 4.

Las gráficas factoriales de interacción y efectos para unidades formadoras de colonias, muestran que la formulación sólida tiene una media mayor tanto en la semana 2 como en la semana 4 (Gráfica 2), estas diferencias se ven más marcadas en la semana 4 debido al efecto del tiempo y la temperatura sobre la viabilidad celular en las tratamientos líquidos. De estos datos es posible inferir que el tratamiento que mantiene más estable las poblaciones en el tiempo es el tratamiento 7: Sólido+4°C, seguido por el tratamiento 5: Líquido+polímero+4 °C.

Semana 2



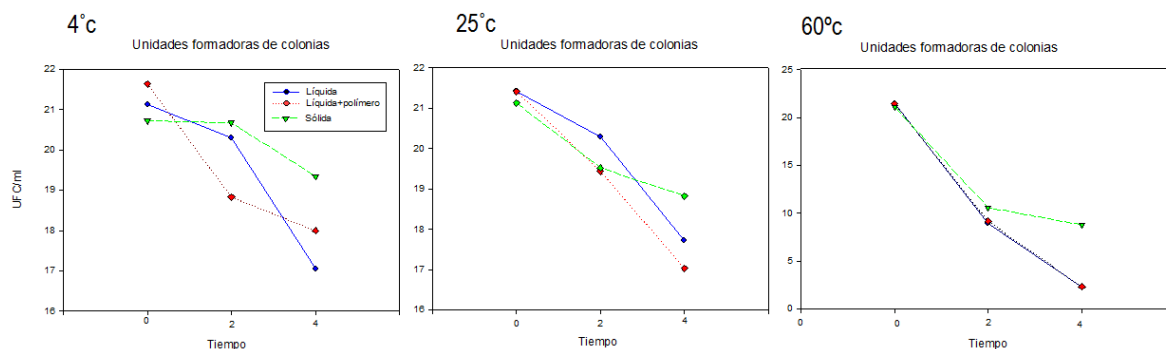
Semana 4



Gráfica 2: Gráficas factoriales (interacción y efectos) para semana 2 y 4. Variable respuesta Unidades formadoras de colonias (UFC)

Estos resultados concuerdan con los estudios de Rojas-Tapias *et al* (2015) y Cortés-Bonilla (2015) en el cual la viabilidad celular de los prototipos con alginato y carragenina fueron mayores que los controles líquidos, por otra parte la estabilidad en los formulados sólidos en el tiempo puede deberse a la eficiencia de la técnica de encapsulación microbiana, se ha demostrado que la viabilidad bacteriana puede mantenerse en este tipo de formulados durante prolongados periodos de tiempo y esto se debe a las características del alginato el polímero más usado en la encapsulación de microorganismos, se sabe que protege a las células del estrés ambiental y permite el almacenamiento a temperatura ambiente por prolongados periodos de tiempo (Bashan *et al* 2006) esto concuerda con el comportamiento de las formulaciones en cada temperatura en función de del tiempo (Gráfica 3) en donde se ve una que la formulacion sólida tiende a mantener poblaciones más elevadas en todas las temperaturas de almacenamiento probadas. Esto también puede deberse a las características de *Azospirillum* que hacen que pueda mantenerse viable bajo el estrés que produce la técnica de encapsulación, mecanismos como el enquistamiento y la producción de Polihidroxitiratos (PHb`s)

puende explicar este fenómeno, se ha demostrado que las bacterias que tienen estas capacidad sobreviven mejor que aquellas que no (Zaady *et al* 1993), existen un reporte de *Azospirillum* en donde mantuvo su viabilidad después de 14 años de almacenamiento en un formulado con alginato.



Gráfica 3. Comportamiento de las unidades formadoras de colonias de los formulados en cada temperatura a través del tiempo

7.2 Producción de índoles:

Para la producción de índoles se observó un efecto de todos los dos factores individualmente y en conjunto (tabla 6). La interacción y el efecto de estos factores se muestran en la gráfica 1. En donde se observa un comportamiento similar a los datos de unidades formadoras de colonias, ya que la producción de índoles fue mayor para las formulaciones sólidas, exceptuando en la temperatura de 4 °C.

Análisis de Varianza

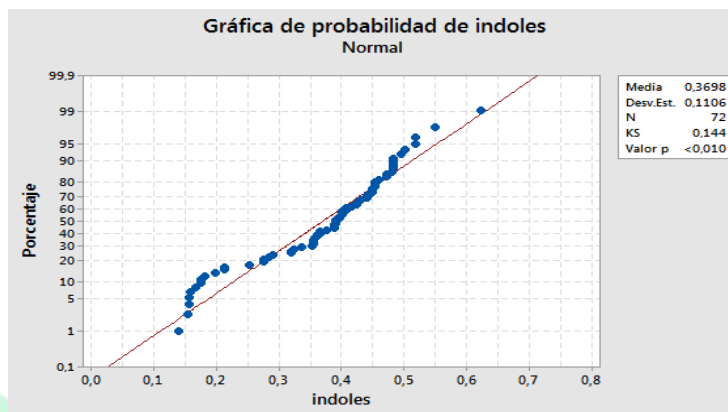
Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
Modelo	11	0,54524	0,049567	8,63	0,000
Bloques	3	0,09055	0,030183	5,26	0,003
Lineal	4	0,39623	0,099058	17,25	0,000
TEMPERATURA	2	0,31762	0,158809	27,65	0,000
FORMULACION	2	0,07862	0,039308	6,84	0,002
Interacciones de 2 términos	4	0,05846	0,014614	2,54	0,049
TEMPERATURA*FORMULACION	4	0,05846	0,014614	2,54	0,049
Error	60	0,34459	0,005743		
Falta de ajuste	24	0,29771	0,012405	9,53	0,000

Error puro	36	0,04688	0,001302
Total	71	0,88983	

Tabla 6. Análisis de varianza, variable respuesta: Indoles. Tiempo: Semana 1, 2, 3, 4.

Validación de supuestos del modelo:

Normalidad:



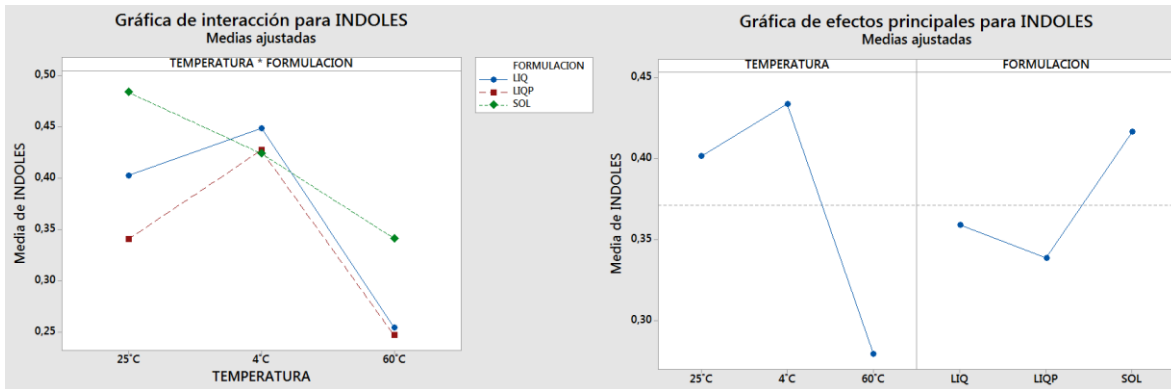
Como $p < 0.05$, se rechazó la hipótesis nula de normalidad de la población, los datos no son normales.

Homogeneidad de varianzas:

Pruebas

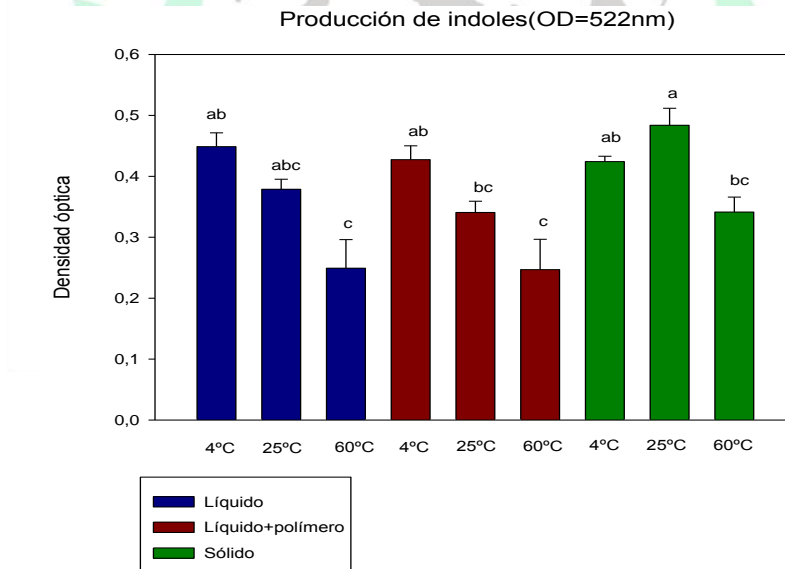
Método	Estadística de prueba	Valor p
Comparaciones múltiples	-	0,382
Levene	1,01	0,438

Con una significancia del 0.05. Se cumple el supuesto de homogeneidad de varianza $p > 0.05$. Las varianzas son homogéneas.

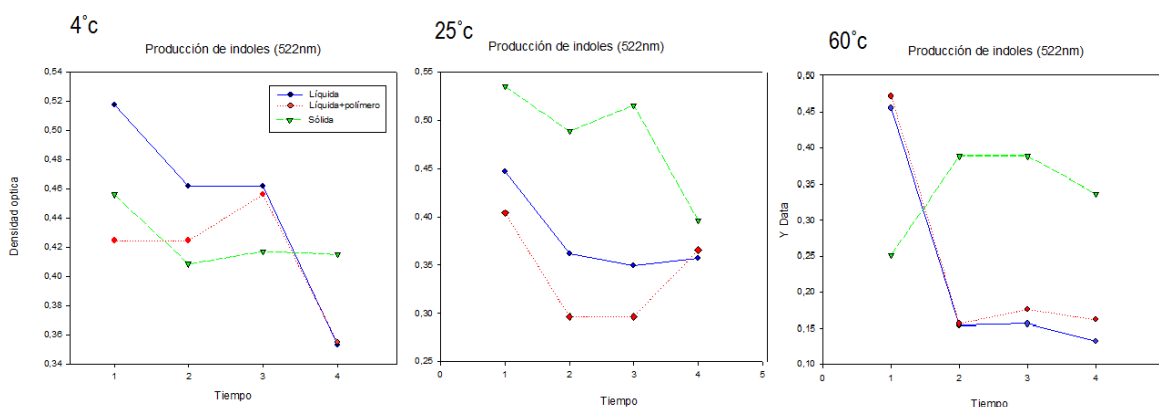


Gráfica 4: Gráficas factoriales (interacción y efectos) para semana 1, 2, 3 y 4. Variable respuesta: Indoles.

El tratamiento que mostró mejores resultados fue el T8: Sólido-25 °C, sin embargo también se vieron diferencias significativas en el tratamiento 9: Sólido- 60°C con respecto a los tratamientos líquidos a la misma temperatura (gráfica 5), resultados que concuerdan con lo visto en los conteos poblaciones y que sugieren que la producción de indoles puede mantenerse más constante a través del tiempo en las formulaciones sólidas (gráfica 6).



Gráfica 5: Producción de indoles media. Semana 1-4.



Gráfica 6. Comportamiento de la producción de índoles en los formulados en cada temperatura a través del tiempo.

La inclusión de la evaluación de la producción de compuestos orgánicos como los índoles en este tipo de estudios pueden ayudar a comprender los mecanismos por los que las bacterias mantienen su viabilidad y da un idea de cómo puede ser el efecto de las formulaciones al aplicarlas a las plantas. El modelamiento es una herramienta aplicada al método científico y en este caso contribuye al entendimiento de los factores involucrados en la producción de biofertilizantes. La preservación de bacterias es un importante campo de investigación debido a la importancia de mantener la consistencia genética de las bacterias y la viabilidad (Malik y Claus 1987). La importancia de este estudio es que el modelo planteado puede ser utilizado como referencia para la evaluación de nuevas formulaciones, nuevas bacterias bajo el análisis de variables respuesta de todo tipo, el adicionar una mayor cantidad de variables aumenta la calidad de la selección y por ende la de la producción, favoreciendo directamente a la agricultura y a los suelos del país con la fabricación de bioproductos de alta calidad.

La mayoría de biofertilizantes comerciales están basados en matrices líquidas o en turba como es el caso de los productos hechos para *Rhizobium*, sin embargo estos poseen una viabilidad que se ve afectada por el tiempo de vida de anaquel, sin embargo son usados ampliamente en todo el mundo, en los últimos años las investigaciones se han enfocado a la reducción de los costos de producción y a la mitigación de los impactos generados sobre el medio ambiente (Albareda *et al* 2008, Fernandes Júnior *et al* 2012, Herrmann y Lesueur 2013). El uso de polímeros ha surgido como una alternativa prometedora para este problema ya que estos pueden mantener las actividades fisiológicas y sobretodo la viabilidad en el tiempo, se sabe que este tipo de matrices son el futuro de la biofertilización y por eso se conocen como biofertilizantes de segunda generación, por esta razón el laboratorio de microbiología agrícola de CORPOICA ha dirigido sus esfuerzos a este tema tan poco estudiado con el fin de producir prototipos de alta calidad

para diversos cultivos del país, de allí la importancia del establecimiento de modelos estadísticos factoriales que permitan ver de una manera cada vez más global el comportamiento de las actividades biológicas de las bacterias dentro de estas formulaciones.

9. CONCLUSIONES:

Los factores formulación y temperatura afectaron a la viabilidad bacteriana y a la producción de índoles de forma significativa, siendo la formulación sólida la que obtuvo los mejores resultados, seguida de la líquida con carragenina.

En la producción de índoles no se vieron diferencias entre las formulaciones en la temperatura de 4°C, pero sí se vieron en las temperaturas de 25°C y 60 °C, donde la formulación sólida tuvo mejores resultados.

Los formulados sólidos producidos bajo la técnica de microencapsulación bacteriana pueden mantener por más tiempo la viabilidad bacteriana relacionada al mantenimiento de la población bacteriana y la producción de compuestos orgánicos implicados en la promoción de crecimiento en plantas.

El modelo cumplió como con los supuestos y se ajustó a los dos factores evaluados. Puede ser aplicado a todo tipo de bacterias promotoras de crecimiento vegetal con un mayor número de factores y de variables respuesta.

RECOMENDACIONES:

Es necesario realizar este tipo de estudios en tiempos no menores a tres meses, para poder dilucidar correctamente el efecto de los factores sobre las variables respuesta a evaluar.

Deben evaluarse más factores que pueden afectar la viabilidad de las bacterias y con esto su efecto sobre las plantas.

El modelo debe probarse en otras cepas para evaluar el efecto diferencial que este puede tener dependiendo de la bacteria.

10. BIBLIOGRAFIA:

Albareda M, Rodríguez-Navarro DN, Camacho M, Temprano FJ (2008) Alternatives to peat as a carrier for rhizobia inoculants: solid and liquid formulations. *Soil Biology and Biochemistry* 40: 2771-2779.

Bacilio M, Rodriguez H, Moreno M, Hernandez J-P, Bashan Y (2004) Mitigation of salt stress in wheat seedlings by a gfp-tagged *Azospirillum lipoferum*. *Biol Fertil Soils* 40:188–193.

Bashan, Y. y L.E. de-Bashan. (2002). Protection of tomato seedlings against infection by *Pseudomonas syringae* pv. tomato by using the plant growth-promoting bacterium *Azospirillum brasilense*. *Applied and Environmental Microbiology* 68: 2637-2643.

Bashan, Y., Hernández, J. P., Puente, M. E., de-Bashan, L. E., & Leyva, L. A. (2006). Inoculantes microbianos sintéticos: son el futuro para la agricultura. *Proceedings of the 22nd International week of parasitology*. Edited by Gallegos, G. Published by: Antonio Narro University, Saltillo, México.

Bashan, Y., Salazar, B. G., Moreno, M., López, B. R., & Linderman, R. G. (2012). Restoration of eroded soil in the Sonoran Desert with native leguminous trees using plant growth-promoting microorganisms and limited amounts of compost and water. *Journal of environmental management*, 102, 26-36.

Becerra-De Armas, E., Lugo-Ruiz, I., Más-Martínez, R., Pineda-Ruiz, E., & Viñas-Quintero, Y. (2014). Uso del biofertilizante *Azospirillum* como proyectos de fuente alternativa para la fertilización nitrogenada de la caña de azúcar. *Metodología para la evaluación integral de reconversión azucarera en el concepto de biorrefinería con enfoque difuso*, 49.

Borrego, J. Á. (sf) CONTROL ESTADÍSTICO DE PROCESOS. Universidad Nacional Abierta y a Distancia. UNAD.

Camelo Rusinque, M. (2015). Desarrollo de un sistema de fermentación líquida y de enquistamiento para una bacteria fijadora de nitrógeno con potencial biofertilizante.

Cárdenas Caro, D. M., Garrido Rubiano, M. F., Roncallo Fandiño, B. A., & Bonilla Buitrago, R. R. (2014). Inoculación con *Azospirillum* spp y enterobacter aglomerans en

pasto guinea (*panicum maximum* jacq.) en el departamento de cesar (colombia). Vol. 67, núm. 2 (2014); 7271-7280 2248-7026 0304-2847.

Cárdenas, D. M., Garrido, M. F., Bonilla, R. R., & Baldani, V. L. (2010). Aislamiento e identificación de cepas de *Azospirillum* sp. en pasto guinea (*Panicum maximum* Jacq.) del Valle del Cesar. *Pastos y Forrajes*, 33(3), 1-1.

Cayre, M., Vignolo, G., & GARRO, O. (2001). Validación y comparación de modelos de crecimiento microbiano. Universidad Nacional Del Nordeste, Comunicaciones Científicas y Tecnológicas. Argentina.

Cortés-Patiño, S. A., & Bonilla, R. R. (2015). Polymers selection for a liquid inoculant of *Azospirillum brasilense* based on the Arrhenius thermodynamic model. *African Journal of Biotechnology*, 14(33), 2547-2553.

Davey, K. R. (1993). Linear-Arrhenius models for bacterial growth and death and vitamin denaturations. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 12(3), 172-179.

De-Bashan LE, Antoun H, Bashan Y (2005) Cultivation factors and population size control uptake of nitrogen by the microalgae *Chlorella vulgaris* when interacting with the microalgae growth-promoting bacterium *Azospirillum brasilense*. *FEMS Microbiol Ecol* 54:197–203.

El-Komy HMA (2005) Coimmobilization of *Azospirillum lipoferum* and *Bacillus megaterium* for successful phosphorus and nitrogen nutrition of wheat plants. *Food Technol Biotech* 43:19–2.

Faggioli, V. S., Cazorla, C. R., Vigna, A., & Berti, M. F. (2003). Fertilizantes biológicos en maíz. Ensayo de inoculación con cepas de *Azospirillum brasilense* y *Pseudomonas fluorescens*. Córdoba, Argentina: Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria, 4.

Fernandes Júnior PI, Da Silva Júnior EB, Da Silva Júnior S, Da Silva e Santos CE, Oliveira PJ, Rumjanek NG, Vieira Martins LM, Xavier GR (2012) Performance of polymer compositions as carrier to Cowpea rhizobial inoculant formulations: Survival of rhizobia in pre-inoculated seeds and field efficiency. *African Journal of Biotechnology* 11(12): 2945-2951.

Glickman E, Dessaux Y. 1995. A Critical examination of the specificity of the salkowsky reagent for indolic compounds produced by phytopathogenic bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 61(2):793-796.

Hernández, Y.; García, D. y Sarmiento, M. (1997) Comportamiento de la guinea (*Panicum maximum*) inoculada con *Azospirillum*. En: XVII Reunión Latinoamericana de Rhizobiología: Resúmenes. La Habana, p.104.

Hernández, Y; Sistachs, E y Prieto, A. (1994) Respuesta del sorgo forrajero (*Sorghum bicolor* vc sudanesa) a la inoculación con *Azospirillum* spp. Revista Cubana de Ciencia Agrícola, 1994, vol. 28, no. 2, p. 245-250.

Herrera, S. M. D., Rossello, F. J., Benavides, M. P., Groppa, M. D., & Zawoznik, M. S. (2017). *Azospirillum brasilense* Az39 marcado con GFP en raíces de *Arabidopsis thaliana*. Revista Argentina de Microbiología.

Herrmann L, Lesueur D (2013) Challenges of formulation and quality of biofertilizers for successful inoculation. *Appl Microbiol Biotechnol* 97: 8859-8873.

James EK (2000) Nitrogen fixation in epiphytic and associative symbiosis. *Field Crop Res.* Krumnow, A. A., Sorokulova, I. B., Olsen, E., Globa, L., Barbaree, J. M., & Vodyanoy, V. J. (2009). Preservation of bacteria in natural polymers. *Journal of microbiological methods*, 78(2), 189-194.

Labuza, T.P., Fu, B. And Taoukis, P. (1992) Prediction for shelf life and safety of minimally processed CAP/ MAP chilled foods: a review. *J. Food Prot.*, 55-74.

LARA, C., & ALVAREZ, A. (2013). IMPACTO DE INOCULACIÓN CON LA BACTERIA NATIVA *Azospirillum* SOBRE *Oryza sativa* L. EN CÓRDOBA--COLOMBIA. *Biotecnología en el Sector Agropecuario y Agroindustrial*, 11(2).

Leguérinel, I., & Mafart, P. (2008). Recent Developments of Predictive Microbiology Applied to the Quantification of Heat Resistance of Bacterial Spores. *Japan Journal of Food Engineering*, 9(1), 1-7.

Malik, K. A., & Claus, D. (1987). Bacterial culture collections: their importance to biotechnology and microbiology. *Biotechnology and Genetic Engineering Reviews*, 5(1), 137-198.

Mogollón, J. P., Martínez, A., & Rivas, W. (2014). Degradación química de suelos agrícolas en la Península de Paraguaná, Venezuela. *Suelos Ecuatoriales*, 44(1), 22-28.

Pla-Sentís, I. (2006). Problemas de degradación de suelos en el mundo: Causas y consecuencias. In *Memorias del X Congreso Ecuatoriano de la Ciencia del Suelo*.(1-9).

Guayaquil: Universidad de Guayaquil. Disponible: <http://www.secsuelo.org/XCongreso/Plenaria/Magistrales/1.-%20Problemas%20de%20Degradacion>. Pdf.

Pla-Sentís, I. (2006). Problemas de degradación de suelos en el mundo: Causas y consecuencias. In Memorias del X Congreso Ecuatoriano de la Ciencia del Suelo.(1-9). Guayaquil: Universidad de Guayaquil. Disponible: <http://www.secsuelo.org/XCongreso/Plenaria/Magistrales/1.-%20Problemas%20de%20Degradacion>. Pdf.

Rivera, D., Obando, M., Barbosa, H., Rojas Tapias, D., & Bonilla Buitrago, R. (2014). Evaluation of polymers for the liquid rhizobial formulation and their influence in the Rhizobium-Cowpea interaction. *Universitas Scientiarum*, 19(3), 265-275.

Rojas-Tapias, D., Ortega Sierra, O., Rivera Botia, D., & Bonilla, R. (2015). Preservation of *Azotobacter chroococcum* vegetative cells in dry polymers. *Universitas Scientiarum*, 20(2), 201-207.

Romero-Perdomo, F. A., Camelo, M., & Bonilla, R. (2015). RESPUESTA DE *Bradyrhizobium japonicum* A LA ADICIÓN DE ALGINATO EN PRESENCIA DE FUNGICIDAS PELETIZADOS EN SEMILLAS DE SOYA. *Revista UDCA Actualidad & Divulgación Científica*, 18(2), 359-364.

Ruiz, T., & Febles, G. (2004). La desertificación y la sequía en el mundo. *Avances en Investigación Agropecuaria*, 8(2), 1-11.

Ruiz, T., & Febles, G. (2004). La desertificación y la sequía en el mundo. *Avances en Investigación Agropecuaria*, 8(2), 1-11.

Sánchez López, Diana Beatriz, Gómez-Vargas, Ruth Milena, Garrido Rubiano, María Fernanda, & Bonilla Buitrago, Ruth Rebeca. (2012). Inoculación con bacterias promotoras de crecimiento vegetal en tomate bajo condiciones de invernadero. *Revista mexicana de ciencias agrícolas*, 3(7), 1401-1415.

Trejo, A., de-Bashan, L. E., Hartmann, A., Hernandez, J.P., Rothballer, M., Schmid, M. and Bashan, Y. (2012). Recycling waste debris of immobilized microalgae and plant growth-promoting bacteria from wastewater treatment as a resource to improve fertility of eroded desert soil. *Environmental and Experimental Botany* 75 : 65-73.

Velazco, A. y Castro, R. (1999) Estudio de la inoculación de *Azospirillum brasilense* en el cultivo del arroz (Variedad A'82) en condiciones de macetas. *Cultivos Tropicales*, , vol. 20, no. 1, p. 5-9.

Yabur, R., Bashan Y., Hernández-Carmona G. 2007. Alginate from the macroalgae *Sargassum sinicola* as a novel source for microbial immobilization material in wastewater treatment and plant growth promotion.

-



