COMUNICACION CORTA
DIMARGON, NUEVO MEDIO DE CULTIVO PARA LA PRODUCCION INDUSTRIAL DE BIOPREPARADOS A BASE DE *Azotobacter chroococcum*

B. Dibut, R. Martínez y R. González

ABSTRACT. A new culture medium containing technical degree mineral salts and national sources was developed, for achieving higher quality and more economic manufacture and application of biopreparations derived from *Azotobacter chroococcum*, so that titles of 10^{11}cells.mL^{-1} are produced in 20 hours, they having a higher quality than those obtained through Ashby and Jensen media and even cheaper (\$0.09.L^{-1}) than them (\$0.23 and 0.19.L^{-1} respectively). Besides, this product keeps a viable biomass concentration for six months when stored at 4°C. Due to the high concentration of this biopreparation, it can be applied in a liquid form at a 1/100 dilution, something which could not be attained through traditional means.

Key words: Biofertilizers, *Azotobacter chroococcum*, culture medium, DIMARGON, costs, storage

RESUMEN. Con el objetivo de lograr una mayor calidad y economía en la fabricación y aplicación de biopreparados a partir de *Azotobacter chroococcum*, se desarrolló un nuevo medio de cultivo basado en fuentes nacionales y sales minerales de grado técnico, con el cual se logran industrialmente títulos de 10^{11} células.mL^{-1} en 20 horas, muy superiores a los obtenidos con los medios Ashby y Jensen y con un costo de fabricación de \$0.09.L^{-1}, muy inferiores a los obtenidos con los anteriores medios de \$0.23 y 0.19.L^{-1} respectivamente. Asimismo, este producto mantiene la concentración de biomasa viable durante seis meses cuando se almacena a 4°C. El biopreparado obtenido, por su elevada concentración, puede aplicarse en forma líquida con una dilución de 1/100, aspecto que no se logra con los medios tradicionales.

Palabras claves: Biofertilizantes, *Azotobacter chroococcum*, medio de cultivo, DIMARGON, costos, almacenamiento

INTRODUCCION

Las bacterias fijadoras de nitrógeno 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 (Nur, Okan y Nenis, 1980; Kapulnik *et al.*, 1981 y Eimerich, 1984).

En Cuba se viene trabajando desde hace años en la inoculación de cultivos económicos con estas bacterias y se han obtenido resultados en condiciones experimentales y de producción agrícola, que permiten ampliar el programa de fabricación industrial del biopreparado, con el fin de aplicarlo sobre grandes superficies.

Como resultado de estos trabajos, se ha puesto de manifiesto la necesidad de utilizar el inoculante en forma líquida, con el objetivo de aprovechar el efecto inmediato de las sustancias fisiológicamente activas, disueltas en el medio sobre la germinación de las semillas, con lo que se han obtenido incrementos del orden del 55 % en pruebas experimentales y hasta de 30 % en condiciones de producción (Dibut, González y Delgado, 1988, y Martínez *et al.*, 1988).

Para lograr la mayor economía en la fabricación y aplicación del biopreparado, se hizo necesario formular un medio de cultivo que permitiera la obtención de una elevada biomasa bacteriana en los fermentadores industriales, lo cual se logró con el nuevo medio DIMARGON, cuya composición tiene carácter reservado por ser para uso industrial y cuyo costo no excedió de \$0.09 el litro.

MATERIALES Y METODOS

El medio DIMARGON se estudió junto con los medios Ashby y Jensen (Subba Rao, 1982) en zaranda termostatada regulada a 30°C y 200 r.p.m., utilizando frascos erlenmeyers de dos litros invaginados, que contenían 200 mL de los medios de cultivo.

El inóculo utilizado se preparó a partir de un cultivo en medio Ashby con un título de 18 x 10^7 células.mL^{-1}, del cual se hicieron inoculaciones al 1 % en cada frasco. La cepa de *A. chroococcum* utilizada fue INIFAT-12, seleccionada previamente por su alto poder de estimulación en plantas de tomate (Dibut, González y Delgado, 1988). La estimación del crecimiento bacteriano se

D. Dibut, Investigador Auxiliar; Dr. R. Martínez, Investigador Titular y R. González, Investigador Agregado, del departamento de Biotecnología, Instituto de Investigaciones Fundamentales en Agricultura Tropical "Alejandro Humboldt", calle 1 esquina a 2, Santiago de las Vegas, La Habana, Cuba.

realizó por el método turbidimétrico (células totales) y por el recuento de células viables en placas.

La optimización del proceso industrial de fermentación utilizando DIMARGON, se realizó primero en un fermentador de 20 litros Biolafitte 78 600, donde se hicieron las modificaciones pertinentes en los parámetros que se obtuvieron en zaranda; posteriormente, se hicieron nuevos ajustes en un fermentador de 300 litros CV-380 y finalmente se completó el escalado en fermentadores Biolafitte de 1 200 L de capacidad.

En estas condiciones se optimizaron los siguientes parámetros: agitación, concentración de O_2 disuelto, pH, temperatura y por ciento de preinóculo y antiespumante.

RESULTADOS Y DISCUSION

En la figura 1 se muestran las curvas de crecimiento de las poblaciones bacterianas, en cada uno de los medios estudiados durante las pruebas en zaranda termostatada. Se pone de manifiesto la multiplicación más rápida de la bacteria en medio DIMARGON, que ya a las 48 horas presenta una población muy superior a las de los otros dos medios.

El punto más alto de la curva coincide en todos los casos a las 144 horas y es un orden superior en el caso del DIMARGON, en comparación con los otros medios probados, lo que indica que la composición del nuevo medio contiene todos los elementos necesarios para lograr la máxima capacidad de división celular de la bacteria, lo que no ocurre con los medios Ashby y Jensen que, por otra parte, son más costosos ($0.23 y $0.19.L^{-1} respectivamente).

En la figura 2 se presenta el perfil de fermentación en condiciones de producción industrial cuando se utiliza el medio DIMARGON. Se observa que, en las condiciones óptimas del proceso de fermentación, el punto máximo del crecimiento se logra en solo 20 horas y el número de células viables (10^{11} células.mL^{-1}) coincide con el máximo valor posible que se puede alcanzar en este género bacteriano.

Se puede observar también la caída de la curva pH en las primeras horas del proceso, hasta acidificar claramente el medio; sin embargo, ocurre un ascenso de la curva a las 16 horas hasta alcanzar la neutralidad, condición que favorece el desarrollo de las bacterias del género *Azotobacter* (Martínez, 1986).

Con el valor de pH que se alcanza al final del proceso, es posible conservar el biopreparado a 4°C durante más de seis meses, sin que la concentración de biomasa viable en el medio y la calidad del biopreparado disminuya, lo que se ha comprobado en varias oportunidades.

La producción industrial de biopreparados que contienen *A. chroococcum* y cuya base es el medio DIMARGON, permite obtener una elevada biomasa bacteriana que puede diluirse hasta 100 veces en el momento de aplicación a los cultivos, a diferencia de los otros medios de cultivo encuestados, los cuales se tienen que utilizar sin diluir.

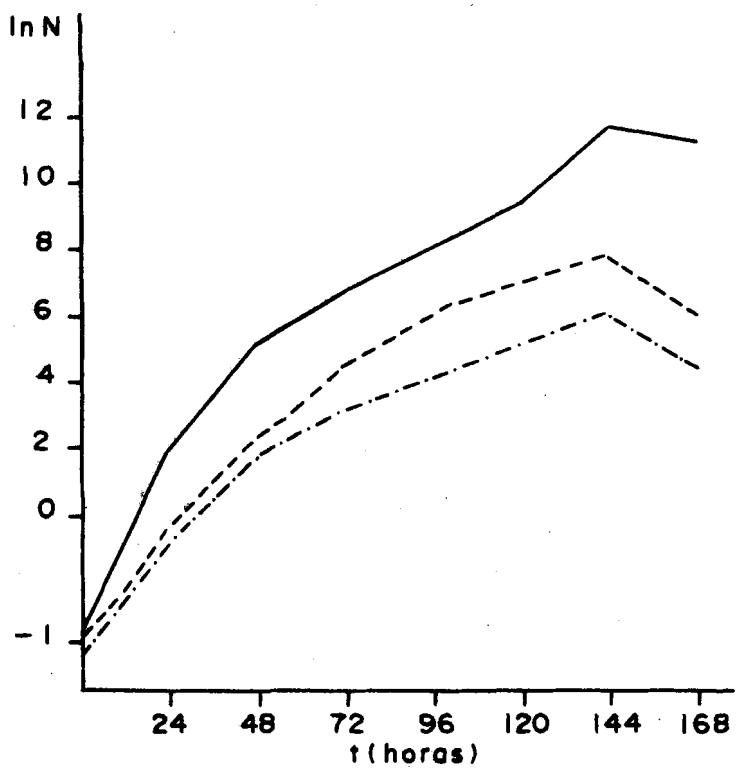

Figura 1. Curvas de crecimiento de *A. chroococcum* en tres medios de cultivos en condiciones de zaranda termostatada

_____ DIMARGON ——— Ashby -.-.-.-.-.-. Jensen

N células totales

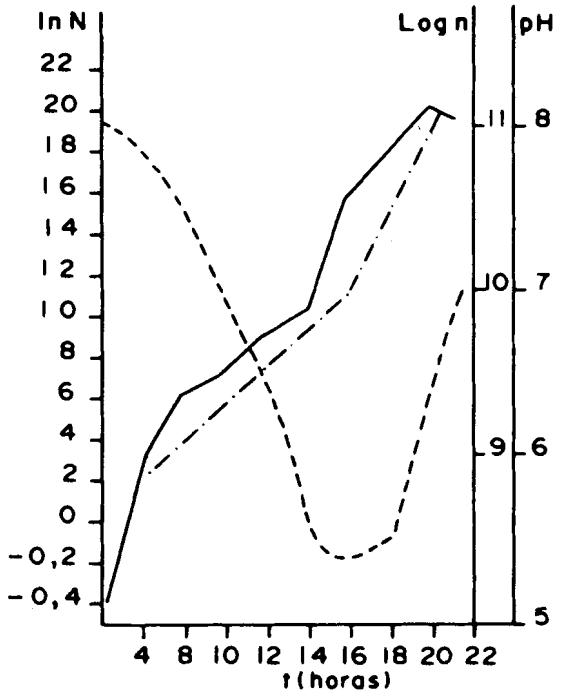

Figura 2. Perfil de fermentación en escala industrial utilizando medio DIMARGON

——— ln. N células totales
-.-.-.-.-.-.- Log. N células viables
——— pH

Por la anterior característica, se reduce la cantidad que es necesario producir, envasar, conservar y transportar hasta las empresas agrícolas, con el consiguiente abaratamiento de los procesos de producción industrial y de aplicación al campo, sin que se pierda la capacidad estimuladora del crecimiento vegetal, lo que ha hecho posible la aplicación masiva de estos biopreparados en la agricultura cubana.

BIBLIOGRAFIA

Dibut, B. Selección de cepas de *Azotobacter chroococcum* estimuladoras del crecimiento en plántulas de tomate para suelos Ferralíticos Rojos. / B. Dibut, R. González, E. Delgado... **En:** Jornada Científica, 5, INIFAT, 1988.-47 p.

Dibut, B. Acción estimuladora de *Azotobacter chroococcum* sobre el cultivo del tomate en suelo Ferralítico Rojo. II. Efecto sobre la plantación. / B. Dibut, R. González, D. Acosta... **En:** Jornada Científica, 5, INIFAT, 1988.- 49 p.

Eimerich, C. Molecular Biology and Ecology of Diazotrophs Associated With Nonleguminous Plants. **Biotechnology** (Nueva York)1:967-970, 1984.

Kapulnik, Y. /*et al*/. Effects of *Azospirillum* Inoculation on Some Growth Parameters and N Content of Wheat, Sorghum and Panicum. **Plant and Soil** 61:65-70, 1981.

Martínez, R. Ciclo del nitrógeno en el suelo. / R. Martínez- La Habana : Editorial Científico-Técnica , 1988.-160 p.

Martínez, R. /*et al*/. Acción estimuladora de *A. chroococcum* sobre el cultivo del tomate en suelo Ferralítico Rojo. I. Efecto sobre los semilleros. / R. Martínez... /*et al*/ **En:** Jornada Científica, 5, INIFAT, 1988.- p 48.

Nur, I., Y. Okon y V. Nenis. An Increase of Nitrogen Content of *Setaria italica* and *Zea mays* Inoculated With *Azospirillum*. **Can. J. Microbiol** .(Ottawa)58:482-485, 1980.

Subba Rao, N. S. Biofertilizers in Agriculture. / N. C. Subba Rao.- Nueva Dehli : IBH Publ; 1982.-180 p.

Recibido: 1 de octubre de 1993
Aceptado: 15 de octubre de 1993

NECESIDADES HIDRICAS DEL CAFETO EN LA FASE DE VIVERO

Durante los últimos años se han ejecutado un conjunto de investigaciones en el INCA, encaminadas a determinar las necesidades hídricas de esta planta en la fase de vivero, analizando de manera integral el comportamiento del cultivo ante diferentes niveles de humedad en el suelo y la influencia de éstos sobre el crecimiento del cafeto.
Estos experimentos modifican con una base científica los criterios que hasta el momento se han empleado para el riego de los viveros, además, posibilitan una economía anual de agua de 584 m^3 por cada 100 000 posturas producidas, lo que representa un ahorro de $ 259.85 como consecuencia de una disminución de los costos por salario, gastos materiales y la amortización de los equipos de riego.

Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas
Subdirección de Desarrollo Técnico
Gaveta Postal No. 1, San José de las Lajas
La Habana, Cuba