

# **DESARROLLO DE TECNOLOGÍAS DE SEGUNDA GENERACIÓN PARA LA FABRICACIÓN INDUSTRIAL Y SEMI-INDUSTRIAL DE BIOFERTILIZANTES A BASE DE LA BACTERIA *AZOTOBACTER CHROOCOCCUM* Y DETERMINACIÓN DE SU EFECTIVIDAD EN CUBA Y OTROS PAÍSES**

**Rafael Martínez Viera, Bernardo Dibut Álvarez, Yoania Ríos Rocafull, Grisel Tejeda González, Janet Rodríguez Sánchez, Marisel Ortega García, Armando García Fernández, Ulises Soca Estrada y Luís Fey Govín.**

***Instituto de Investigaciones Fundamentales en Agricultura Tropical (INIFAT)***

***Dirección Postal: Calles 1 y 2 (Santiago de las Vegas), CP 17 200***

***Teléfono: 6839014 Fax: 6839010***

***E-mail: rmartinez@inifat.co.cu***

## **Resumen ampliado**

En Cuba comenzó el estudio de las bacterias del género *Azotobacter* en el INIFAT a partir de 1980 y, en 1990, al inicio del Período Especial, debido a la escasez de fertilizantes minerales, comenzaron a utilizarse en la práctica agrícola los biofertilizantes a base de estas bacterias, utilizando una tecnología que exigía la aplicación de 20 L/ha. A partir de 1991 se realizó la fabricación en el país aprovechando instalaciones industriales que solo estaban parcialmente utilizadas, lo que permitió la sustitución de una parte importante del fertilizante del que se carecía en unas 200 000 ha de tierras cultivadas.

A partir de 1995 se profundizaron las investigaciones para obtener biofertilizante con mayor efectividad, y ya después del año 2000 se obtuvieron importantes resultados que han permitido obtener bioproductos de segunda generación, con cuya aplicación hoy es necesario utilizar solamente 1 L/ha en el caso de preparados líquidos o 0.5 L/ha si se utiliza un sustrato en polvo, y se han desarrollado nuevos biopreparados cuya efectividad ha sido demostrada en Argentina, Colombia, España, Isla de Guadalupe, México, Nicaragua, Perú, Turquía y Venezuela (Martínez Viera et al., 2001, 2007a). En algunos de estos países se ha realizado la transferencia tecnológica.

Para hacer efectiva la tecnología de segunda generación se creó un esquema nuevo para la Ciencia, que incluye descubrimientos realizados en los últimos tiempos y que permite la selección de las cepas bacterianas con más efectividad mediante la ejecución de los siguientes pasos, de los cuales los nuevos aportes se ofrecen en negritas:

1.- Aislamiento de cepas a partir de los diferentes agroecosistemas del país. Este trabajo permite contar con una colección de más de 100 cepas de bacterias del género *Azotobacter* a partir de la cual se continuó el trabajo de selección.

2.- Realización de pruebas de quimiotaxismo para realizar una primera selección de cepas en base a las que tuvieran una mayor atracción quimiotáctica por parte de las secreciones de las raíces. A modo de ejemplo, en la Tabla 1 pueden verse algunos de los resultados obtenidos en las evaluaciones para seleccionar la cepa más apropiada para el cultivo de la cebolla (Dibut, 2000). En esta tabla puede observarse que la cepa INIFAT-17 fue la que mostró una mayor respuesta quimiotáctica frente a las secreciones de las raíces de cebolla. (NUEVA TECNOLOGÍA)

Tabla 1. Efecto quimiotáxico de los exudados totales de las plantas de cebolla sobre distintas cepas de *A. chroococcum* (expresado en log de X) (Dibut, 2000).

Variantes	INIFAT -17		INIFAT-15		INIFAT-3		INIFAT-10	
	Log X	FactorC	Log X	FactorC	Log X	Factor C	Log X	Factor C
Exudados	7.87	3584	5.03	613	7.84	3287	5.11	660
Control	4.32	-	4.25	-	4.30	-	4.24	-

Factor C= Factor quimiotaxis. Relación de células atraídas por los exudados/células atraídas por buffer de fosfato  
X= Número de células atraídas

3.- Determinación de la actividad reductora de acetileno a etileno (ARA) o de solubilización del fósforo del suelo. Los valores que se obtuvieron en la evaluación de las cepas seleccionadas en el paso anterior oscilaron entre 12.2 y 25 nmol de  $C_2H_2$ /h. De todas ellas se destacó la INIFAT-8, con 24.46 nmol  $C_2H_2$ /h (Dibut et al., 2004).

4.- Ejecución de pruebas encaminadas a determinar la actividad de las cepas seleccionadas en el paso anterior para estimular el desarrollo de las plantas. Este trabajo se ejecutó de acuerdo con la metodología descrita por Martínez Viera et al. (2007). (NUEVA TECNOLOGÍA)

5.- Determinación bioquímica de las sustancias activas sintetizadas por las cepas que mejor se comportaron en el paso anterior. (NUEVA TECNOLOGÍA). Estas cepas son capaces de sintetizar una alta concentración de vitaminas, una gama de 14 aminoácidos con una alta concentración de muchos de ellos y. en el caso de la actividad citoquinínica se demostró que era casi 10 veces superior en la cepa cubana en comparación con la reportada para cepas aisladas de suelos templados, lo cual permite obtener mayores beneficios en la aplicación agrícola de estos biofertilizantes (Dibut, 2000).

6.- Identificación de las cepas seleccionadas. Las principales características determinadas en la identificación de las cepas estudiadas permitieron confirmar que las cepas más efectivas pertenecen a la especie *Azotobacter chroococcum*.

7.- Realización de las pruebas toxicológicas para demostrar la total inocuidad de estas bacterias. En total, se hicieron 9 pruebas obligatorias de acuerdo con el CODEX cubano, cuyos resultados sirvieron para validar esta inocuidad.

El resultado de la ejecución de todos estos pasos permite contar con cepas seleccionadas de forma integral, capaces de aportar a los cultivos entre 30 y 50% de sus necesidades de nitrógeno y de sintetizar sustancias activas que estimulan la germinación, el desarrollo y el rendimiento de los cultivos donde han sido inoculadas.

II.- La aplicación de los conocimientos sobre nutrición de las bacterias del género *Azotobacter* permitió a nuestro grupo de trabajo el desarrollo de dos nuevos medios de cultivo patentados (DIMARGON y DIMARGON MODIFICADO), con cuya utilización se consigue obtener poblaciones hasta de  $10^{13}$  células /mL, lo que permite una aplicación altamente efectiva en el campo de solo 1 L/ha del biofertilizante. Este medio constituye la Patente de Invención N° 0234/03 de Cuba y N° TR 1998 00291 B de Turquía y puede ser aplicado a través del sistema de riego o por aspersión, se aumentó la conservabilidad del producto y se demostró su inocuidad.

El alto grado de efectividad del nuevo biofertilizante permitió obtener importantes resultados en México, Venezuela, Colombia, Turquía y España, donde hay fábricas organizadas por Cuba dedicadas a la fabricación de estos bioproductos, ingresando al país entre los años 2004 y 2007 un total de 139 900 USD por concepto de asesoramiento y royalties. La nueva tecnología permitió reportar en Cuba, por primera vez en el mundo, la fijación de nitrógeno en plátano, considerado un cultivo no fijador. Los resultados obtenidos en nuestro país con la aplicación de la nueva tecnología en todos los cultivos, han sido convincentes y demuestran la posibilidad de reducir entre 30 y 50% las aplicaciones de fertilizante nitrogenado, lográndose incrementos de los rendimientos entre 10-20% por la acción de las sustancias activas. El costo de fabricación de 1 L del biofertilizante es \$ 1.23, con un componente en divisas de 0.48 USD que puede recuperarse. Se describen los beneficios económicos y sociales aportados por las aplicaciones.