

## Escalado de la producción de un biofertilizante a base de *Pseudomonas fluorescens*

María Cristina Pérez Peñaranda<sup>1\*</sup> <https://orcid.org/0000-0001-6001-017X>

Julio Oramas García<sup>1</sup> <https://orcid.org/0000-0001-7230-874X>

Emilio Arcadio Sotolongo Valdés<sup>2</sup> <https://orcid.org/0000-0001-7839-3148>

Jessica Valdivia Pérez<sup>2</sup>

Yoandra Román Tabío<sup>1</sup> <https://orcid.org/0000-0001-9414-1928>

Yoel Beovides García<sup>3</sup> <https://orcid.org/0000-0001-5709-0113>

Jaime Simó González<sup>3</sup> <https://orcid.org/0000-0003-2689-7920>

<sup>1</sup>Unidad de Desarrollo–Innovación del Grupo Empresarial Laboratorios Biológicos Farmacéuticos (LABIOFAM). Ave. Independencia km 16 ½. Boyeros. La Habana. Cuba.

<sup>2</sup>Facultad de Ingeniería Química, Universidad Tecnológica de La Habana. Calle 114, No. 11901, entre Ciclovía y Rotonda. Marianao. La Habana. Cuba.

<sup>3</sup>Instituto de Investigaciones de Viandas Tropicales (INIVIT). Apartado 6. Santo Domingo. Villa Clara. Cuba. CP 53 000.

\*Autora para correspondencia e-mail: [mcperezpenaranda@gmail.com](mailto:mcperezpenaranda@gmail.com)

### RESUMEN

En estudios previos se optimizó un medio de cultivo semisintético para la producción industrial de una cepa de *Pseudomonas fluorescens* promotora del crecimiento vegetal. Este trabajo se propuso desarrollar el escalado para la producción del biofertilizante. Se seleccionaron los criterios para el escalado teniendo en cuenta la no similitud geométrica de los fermentadores utilizados (42 y 500 litros). La efectividad técnica del bioproducto resultante se evaluó en formulación líquida sobre plantas *in vitro* de banano cv. Manzano (*Musa AAA*) en fase de aclimatización (inmersión de raíces 10, 15, 20 y 25 min) y en el cultivo de esquejes de *Ipomoea batatas* en campo aplicado al suelo a razón de 20 l ha<sup>-1</sup>. Los resultados demostraron que bajo las condiciones ensayadas se obtuvo crecimiento bacteriano con cinética similar en dos escalas. Las fermentaciones concluyeron a las 12 horas de iniciado el cultivo. Las plantas producidas *in vitro* de banano, respondieron mejor cuando las inmersiones en el biofertilizante ocurrieron durante 20 min. En el cultivo del boniato se obtuvo una respuesta positiva cuando se combinó con fertilizantes minerales y se logró una disminución del 25% de la dosis recomendada. La producción de un biofertilizante a base de *Pseudomonas fluorescens* puede llevarse a cabo en un fermentador de tanque agitado de 500 l (volumen efectivo de 350 l) durante 12 h con velocidad de agitación de 266 rpm y flujo de aire de 105 l min<sup>-1</sup> lo cual garantiza una concentración de 1x10<sup>9</sup> UFC ml<sup>-1</sup> y su efecto promotor del crecimiento en plantas.

Palabras clave: banano, biofertilizante, boniato, escalado

### Scale up *Pseudomonas fluorescens*-based biofertilizers production

#### ABSTRACT

In previous studies, a semi-synthetic culture medium was optimized for the industrial production of a plant growth-promoting strain of *Pseudomonas fluorescens*. This work was proposed to develop the scale up for producing the biofertilizer. The criteria for scale up were selected taking into account the geometric non-similarity of the fermenters used (42 and 500 liters). The technical effectiveness of the resulting bioproduct was evaluated in liquid formulation on *in vitro* plants of banana cv. Manzano (*Musa AAA*) in the acclimatization stage (root immersion

10, 15, 20 and 25 min) and in the field cultivation of *Ipomoea batatas* applied to the soil at a rate of 20 l ha<sup>-1</sup>. The results showed that under the conditions tested, bacterial growth was obtained with similar kinetics on two scales. The fermentations concluded 12 hours after the start of the culture. The banana *in vitro* plants responded better when the immersions in the biofertilizer occurred for 20 min. In the cultivation of sweet potato a positive response was obtained when it was combined with mineral fertilizers and a reduction of 25% of the recommended dose was achieved. The production of a biofertilizer based on *Pseudomonas fluorescens* can be carried out in a 500 l stirred tank fermenter (effective volume 350 l) for 12 h with stirring speed of 266 rpm and air flow of 105 l min<sup>-1</sup> which guarantees a concentration of 1x10<sup>9</sup> CFU ml<sup>-1</sup> and its plant growth promotion effects.

Keywords: banana, biofertilizer, scale up, sweet potato

## INTRODUCCIÓN

El sistema de agricultura convencional es fuertemente dependiente de fertilizantes sintéticos y plaguicidas. Además, utiliza grandes cantidades de combustibles fósiles, agua y suelo de forma insustentable. El uso de cantidades cada día mayores de estos productos químicos ha contribuido al deterioro de la estructura, textura y balance de nutrientes del suelo del suelo, a la reducción de las poblaciones microbianas y de la microfauna (Vessey, 2003; Stamenković *et al.*, 2018). Por ello, minimizar el efecto adverso al medio ambiente es de gran interés para la agricultura (Aguado-Santacruz, 2012). En la Estrategia Ambiental Cubana se incluye la degradación de suelos como uno de los cinco problemas ambientales principales del país sustentado en los resultados de más de 30 años de investigación científica sobre la situación de los suelos, bosques, recursos hídricos y calidad de la atmósfera. El uso reiterado e indiscriminado de estas prácticas han provocado que un 60% de los suelos cubanos tengan contenidos de materia orgánica de bajo a muy bajo (Martínez *et al.*, 2017).

La imperante necesidad de buscar vías que mejoren la eficiencia en la utilización de los fertilizantes minerales y el auge en la implantación de tecnologías cada vez más respetuosas del ecosistema y los recursos naturales, han dado nueva vida e impulso notable a la idea del uso de los biofertilizantes (Rojas-Solís *et al.*, 2013). En el mundo adquiere mayor importancia el empleo de biofertilizantes, no sólo por los rendimientos que suelen alcanzarse sino también por lo económico de su aplicación y su contribución a la preservación del medio ambiente (Nuñez *et al.*, 2013).

La presión competitiva en la industria biotecnológica hace necesario contar con procedimientos de escalado rápidos y directos desde los laboratorios de investigación-desarrollo, para poder acortar el tiempo que transcurre entre la concepción de un nuevo producto y la puesta en marcha de la planta correspondiente a escala industrial (Guerra *et al.*, 2009). Gran parte de los procesos biotecnológicos son aerobios y se llevan a cabo en biorreactores tipo tanque agitado, razón por la que se han desarrollado diversas investigaciones para comprender la teoría de escalado en este tipo de proceso. En el caso de la fermentación aeróbica, el predecir resultados a escala de producción basados en el escalamiento de datos obtenidos en el laboratorio o en la planta piloto requiere un análisis cuidadoso de cada una de las escalas, tanto en sus variables fisicoquímicas como biológicas (Dunn *et al.*, 2003).

En su concepción más simple, el escalado se refiere al paso de una escala a otra, durante el proceso de desarrollo de un nuevo producto o tecnología. Un proceso de escalado ascendente permite construir un sistema a una mayor escala teniendo como base los resultados de una escala menor. Particularmente la industria de bioprocesos presenta requisitos adicionales como el mantenimiento de las condiciones ambientales óptimas, la concentración de sustrato y biomasa, el mezclado, el estrés hidrodinámico, el control y regulación de la temperatura, además de la estabilidad de las células debido a la agitación mecánica, entre otras. El medio de cultivo para el crecimiento microbiano debe tener los nutrientes necesarios, que estén disponibles y con bajo costo (Stamenković *et al.*, 2018).

Para conseguir un escalado exitoso, hay que aplicar un conjunto de técnicas, metodologías,

y procedimientos que permitan, transferir los datos de los modelos al prototipo. Sin embargo, la metodología o técnicas a utilizar tienen que tener un compromiso lo mayormente posible entre tiempo, coste y complejidad. Incluso existiendo diferentes metodologías, no habrá ninguna que sea perfecta o no tenga algún problema siendo en algunos casos más útiles unas que otras, o incluso siendo lo ideal una combinación de ellas (Pérez, 2016).

Un obstáculo para el escalado lo constituyen las condiciones que afectan el crecimiento de los microorganismos y la formación de productos en un proceso bioquímico (temperatura, pH, velocidad de agitación y concentración de nutrientes). Por otra parte, las variables más críticas son la temperatura y la concentración de oxígeno pues al incrementar el volumen se hace más difícil la transferencia de calor y la transferencia de masa, siendo necesarios sistemas más eficientes de calentamiento, agitación y aireación. Existen varios criterios de escalado que se encuentran directamente vinculados con las variables que afectan significativamente el sistema, entre ellas el número de Reynolds, tiempo de mezcla, velocidad de agitación, flujo de aire, velocidad en la punta del impelente, potencia por unidad de volumen y coeficiente volumétrico de transferencia de masa (Londoño, 2007; Olivares, 2010; Ali *et al.*, 2018).

En estudios previos se demostró que para la producción industrial de una cepa de *Pseudomonas fluorescens*, solubilizadora de fosfatos, productora de sustancias estimuladoras del crecimiento vegetal y antibióticos (Bach, 2002) y la formulación de un bioproducto a partir de esta, puede emplearse un medio de cultivo semisintético optimizado, que unido al empleo de una velocidad de agitación y flujo de aire óptimos permiten incrementar el contenido de biomasa bacteriana (Pérez *et al.*, 2019). En aras de dar continuidad a esa investigación este trabajo se propuso

como objetivo desarrollar el escalado para la producción del biofertilizante.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Cepa de *Pseudomonas fluorescens*

Las fermentaciones se realizaron con una cepa de *Pseudomonas fluorescens*, conservada por liofilización, del cepario de la Unidad Productora de Vacunas Virales y Bacterianas (UP-7) de LABIOFAM.

### Fermentadores

En el escalado del proceso productivo para obtener el biofertilizante a base de *P. fluorescens* se emplearon un fermentador de 42 litros (modelo Techtors-s, IFORSHT) y uno de 500 litros (modelo MD-500, Marubishi, Japón) de tanques agitados (Tabla 1).

Se empleó el medio de cultivo optimizado para esta cepa por Pérez *et al.* (2019). La fuente de carbono utilizada contenía 5.6% de azúcares reductores cuantificados mediante la técnica del ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS) (Miller, 1959) y el agua un pH de 7.6. La masa de cada macronutriente para un volumen efectivo ( $V_E$ ) de 35 l fue de 350 g para la fuente de carbono, 140 g para la fuente de nitrógeno y 35 g para la fuente de fósforo. Para un  $V_E$  de 350 l se añadió 10 veces cada nutriente.

### Criterios para el escalado del proceso

Para el escalado se utilizó el método de la Regla del Pulgar que se basa en establecer un criterio de escalado que se mantendrá constante durante todo el proceso, a través de las diferentes escalas. Agrupa las variables del proceso en tres categorías: variables químico-físicas, variables geométricas y variables de operación (San Juan *et al.*, 2010).

Tabla 1. Características de los fermentadores utilizados para el escalado productivo de la cepa de *Pseudomonas fluorescens*.

Fermentador (litros)	Volumen de Trabajo efectivo (l)	Número de impulsores	Diámetro de impulsor (cm)	Diámetro del tanque (cm)
42	35	3	8.9	26.7
500	350	2	25	75

Con el objetivo de establecer las variables de escalado para la fermentación de *P. fluorescens* a escalas de volumen de 42 l y 500 l se determinó la velocidad de agitación (N) y el flujo de aire (Q) y se calcularon las relaciones adimensionales  $H_T/D_T$ ,  $H_L/D_T$ ,  $D_T/D_i$ ,  $H_L/D_i$ ,  $D_i/L_i$  y  $D_i/A_i$  (Ruiz y Álvarez, 2011) donde:  $H_T$ : altura del tanque,  $H_L$ : altura del líquido,  $D_T$ : diámetro del tanque,  $D_i$ : diámetro del impelente,  $L_i$ : largo de la hoja del impelente y  $A_i$ : ancho de la hoja del impelente.

Para determinar si la condición de similitud geométrica entre las dos escalas se cumplía se utilizó el factor geométrico ( $F_G$ ) según la ecuación (Ec 1):

$$F_G = \frac{\sqrt{\frac{D_T}{D_i} * \frac{H_L}{D_i}}}{3}$$

Dónde:  $D_T$  diámetro del tanque,  $H_L$  altura del líquido,  $D_i$  Diámetro del impelente

Posteriormente se determinó la velocidad de agitación (N) y el flujo de aire (Q) (Roque, 2010; San Juan *et al.*, 2010).

Ecuación (Ec 2) para el cálculo de la velocidad de agitación aplicando el criterio de velocidad en la punta del impelente ( $ND_i$ ) constante:

$$N_2 = N_1 \frac{D_{i1}}{D_{i2}}$$

Donde:

N: velocidad de agitación (rpm)

$D_i$ : diámetro del impelente (cm)

Los subíndices 1 y 2 se corresponden con la escala de referencia y la escala de interés respectivamente.

Ecuación (Ec 3) para el cálculo del flujo de aire aplicando el criterio de velocidad superficial del gas ( $v_s$ ) constante con la relación entre el flujo de aire y la velocidad superficial del gas:

$$v_s = \frac{Q}{\frac{\pi}{4} D_T^2}$$

Ecuación (Ec 4) para determinar la relación entre los flujos de aire de las dos escalas (San Juan *et al.*, 2010):

$$Q_2 = Q_1 \left( \frac{D_{T2}}{D_{T1}} \right)^2$$

Donde:

Q: flujo de aire ( $l \text{ min}^{-1}$ )

$D_T$ : diámetro del tanque (cm)

Además, se calculó la velocidad de agitación de acuerdo con los criterios de potencia por unidad de volumen constante ( $P/V$ ), velocidad tangencial constante ( $ND_i$ ) y tiempo de mezclado constante (Tabla 2). Igualmente se calculó el flujo volumétrico teniendo en cuenta el número de aireación constante ( $Na$ ), la velocidad superficial constante ( $v_s$ ) y el flujo de aire por unidad de volumen de medio constante (vvm) (Tabla 3).

### Fermentación

Con vistas a corroborar la efectividad de los criterios seleccionados, se determinó la cinética de crecimiento bacteriana en los fermentadores de 42 l y 500 l con volúmenes efectivos de 35 l y 350 l, respectivamente y un tiempo de 12 horas de fermentación. Se realizaron tres fermentaciones en cada uno.

#### 35 l de volumen efectivo

*Obtención del preinóculo:* se prepararon cuatro Erlenmeyers de 1 l de capacidad con 400 ml de medio de cultivo cada uno y se ajustó el pH=7.6. Se esterilizó en autoclave a  $121 \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$  y 0.145 MPa durante 25 minutos. Luego se adicionaron 10 ml del medio de cultivo a cada tubo de la cepa conservada, se agitó hasta desprender el cultivo y la suspensión de células obtenida se añadió a los Erlenmeyers a razón de dos tubos por cada uno. El preinóculo permaneció en agitación a 220 rpm durante 12 horas a  $30 \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$ . Mediante la observación de los caracteres morfológicos de las células bacterianas en la tinción de Gram se comprobó la pureza del cultivo.

*Obtención del inóculo:* se prepararon 4 litros de medio de cultivo, a pH 7.6 y se distribuyó en 13 Erlenmeyers de 500 ml con 300 ml de medio de cultivo en cada uno que se esterilizaron en autoclave a  $121 \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$  y 0.145 MPa durante 25 minutos. Se inoculó cada uno con 30 ml del preinóculo y se incubaron en zaranda rotatoria durante 12 horas a  $30 \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$  y 220 rpm. La pureza se evaluó mediante la tinción de Gram.

Tabla 2. Criterios para el cálculo de la velocidad de agitación (Aiba *et al.*, 1973; Quintero, 1993).

Criterios	Relación
Potencia por unidad de volumen constante (P/V)	$\frac{N_2}{N_1} = \left(\frac{D_{i1}}{D_{i2}}\right)^{2/3}$ Ecuación utilizada para tanques geoméricamente similares y régimen turbulento en ambas escalas.
Velocidad tangencial constante (ND <sub>i</sub> )	$\frac{N_2}{N_1} = \frac{D_{i1}}{D_{i2}}$
Tiempo de mezclado constante	$\frac{N_1}{N_2} = \left(\frac{D_{i1}}{D_{i2}}\right)^4$ Ecuación utilizada para tanques geoméricamente similares y régimen turbulento en ambas escalas

Leyenda: N- velocidad de agitación, D<sub>i</sub> - Diámetro del impelente

Tabla 3. Criterios para el cálculo del flujo volumétrico (Aiba *et al.*, 1973; Quintero, 1993).

Criterios	Relación
Número de aireación constante (Na)	$\frac{Q_2}{Q_1} = \left(\frac{D_{i2}}{D_{i1}}\right)^{7/3}$ Ecuación utilizada para tanques geoméricamente similares y régimen turbulento en ambas escalas.
Velocidad superficial constante (v <sub>s</sub> )	$\frac{Q_2}{Q_1} = \left(\frac{D_{i2}}{D_{i1}}\right)^2$
Flujo de aire por unidad de volumen de medio constante (vvm)	$\frac{Q_2}{Q_1} = \left(\frac{D_{i2}}{D_{i1}}\right)^3$ Ecuación utilizada para tanques geoméricamente similares

Leyenda: Q- Flujo de aire, D<sub>i</sub> - Diámetro del impelente

**Fermentación:** previo a la fermentación se esterilizó el fermentador con todos sus accesorios con vapor a 0.152 MPa, a 130 ± 1 °C durante 40 minutos. Se dejó enfriar hasta 30 ± 1 °C y se procedió a realizar el vertimiento del inóculo, se ajustó la presión, aireación y agitación según los parámetros estimados. Se determinó el crecimiento celular por DO<sub>600</sub> al inicio y cada dos horas y se calculó la velocidad máxima de crecimiento a partir de las curvas de crecimiento (Pérez *et al.*, 2019). La pureza fue evaluada mediante la tinción de Gram y se cuantificaron las Unidades Formadoras de Colonias (UFC ml<sup>-1</sup>) en medio de cultivo King B como criterio de contenido bacteriano viable en la biomasa.

**350 l de volumen efectivo**

**Preparación del inóculo:** se utilizó como inóculo el producto de la fermentación de 35 l de volumen efectivo.

**Fermentación:** una vez que el fermentador se esterilizó, se dejó enfriar y al alcanzar 30±1 °C se adicionó el inóculo, correspondiente al

10% del volumen efectivo. Se ajustaron los parámetros para la fermentación según los criterios seleccionados. El crecimiento celular por se determinó por DO<sub>600</sub> al inicio de la fermentación y cada dos horas. La pureza fue evaluada mediante la tinción de Gram y se cuantificaron las Unidades Formadoras de Colonias (UFC ml<sup>-1</sup>) en medio de cultivo King B.

Se realizaron tres corridas experimentales para cada volumen de fermentación. Con los datos obtenidos de la densidad óptica se construyó la curva de crecimiento correspondiente a cada una de las fermentaciones, se calculó el promedio y la desviación estándar y se obtuvieron las curvas típicas de crecimiento de la cepa para los dos volúmenes de fermentación (35 l y 350 l efectivos).

Evaluación del efecto del biofertilizante a base de *P. fluorescens* sobre el crecimiento de plantas

En el Instituto de Investigaciones de Viandas Tropicales (INIVIT) se realizaron experimentos con el objetivo de evaluar el efecto de la

aplicación del biofertilizante en formulación líquida. Las dosis utilizadas fueron a razón de 20 l ha<sup>-1</sup> en 400 l ha<sup>-1</sup> de solución final.

Los estudios para la validación de la efectividad técnica se realizaron a partir de los esquemas de suministro de nutrientes recomendados para los cultivos en los Instructivos Técnicos vigentes (INIVIT, 2012).

#### *Aclimatización de plantas in vitro de banano*

Se utilizaron plantas de banano cv. 'Manzano' (*Musa AAA*) producidas *in vitro* que se encontraban en fase de enraizamiento.

Los experimentos consistieron en evaluar diferentes tiempos de inmersión de las raíces de las plantas en una solución del biofertilizante preparada para una dosis de aplicación de 20 l ha<sup>-1</sup>, antes de la plantación en bolsas de polietileno (20 x 12.5 cm) en la fase de aclimatización.

Se utilizó el sustrato constituido por 70% de materia orgánica (cachaza) y 30% de suelo rojo certificado por el laboratorio de Suelos. El riego se efectuó por aspersión, con un sistema de nebulizadores para garantizar 80% de la capacidad campo del sustrato y más del 85% de humedad relativa ambiental. Se aplicó *Trichoderma harzianum* a razón de 400 g m<sup>-3</sup> al sustrato antes de la plantación y se mantuvo protegido con una malla antiáfidos debajo de la malla que regula la intensidad luminosa.

Los tratamientos consistieron en la inmersión de las raíces de las plantas durante 10, 15, 20 y 25 min. Como control se usó una variante de inmersión de las raíces en agua durante 10 minutos.

Se emplearon 100 plantas por tratamiento y de ellas se seleccionaron 20, según un diseño completamente aleatorizado, para las evaluaciones de las variables previstas a los 60 días después de plantación (ddp).

Se evaluaron las siguientes variables: supervivencia (%), altura de la planta (ALTP) (cm), número de hojas abiertas (NHOJ), longitud del pecíolo (LPEC) (cm), largo (LHOJ2) y ancho de la hoja No. 2 (AHOJ2) (cm), el área foliar de esa hoja (AF) (cm<sup>2</sup>) y la distancia entre las hojas No. 2 y No. 3 (DHOJ2-3) (cm). El área foliar se determinó por el largo y el ancho (cm)

de la segunda hoja verdadera abierta, mediante la fórmula  $\text{Área} = \text{Ancho} \times \text{largo} \times 0.8$  donde 0.8 fue el factor de corrección para la forma de la hoja.

#### *Cultivo de boniato (Ipomoea batatas L.) cultivar 'INIVIT B 2005'*

Los estudios se realizaron en un suelo Pardo mullido carbonatado (Hernández *et al.*, 2015). Se utilizó como material vegetal de propagación esquejes de punta y pre-punta de 25-30 cm de longitud procedentes de bancos de semilla.

Las dosis de fertilizantes utilizadas como 100% NPK correspondieron a las que se recomiendan en el Instructivo Técnico del cultivo del boniato (INIVIT, 2012) (9-13-17, 0.75 t ha<sup>-1</sup>) y se aplicó con humedad del suelo en bandas y tapado a los 25-30 días de la plantación.

El biofertilizante en su formulación líquida a razón de 20 l ha<sup>-1</sup> fue aplicado en dos momentos, una primera aplicación en el momento de la plantación y la otra en el hilo del surco a los 20 días.

Se realizaron tres aporques (10, 20 y 30 días después de la plantación). Se efectuaron cinco riegos durante el ciclo, por aspersión, y con una norma parcial de 250 m<sup>3</sup> ha<sup>-1</sup>. El riego se suspendió 15 días antes de la cosecha a los 140 días después de la plantación.

Se estudiaron seis tratamientos y sus características se describen en la tabla 4.

Durante el ciclo del cultivo y en la cosecha se realizaron las siguientes evaluaciones:

*Porcentaje de brotación de los esquejes (%)*: se contabilizó el número de esquejes brotados por parcela a los 15 días de la plantación y el valor fue expresado en porcentaje a partir del número de esquejes iniciales.

*Cobertura del campo por el follaje (días)*: el cierre de la parcela por el follaje se determinó por apreciación, y se consideró cerrada cuando la cobertura alcanzó el 75% de la superficie.

*Rendimiento agrícola del boniato (t ha<sup>-1</sup>)*: se determinó a los 140 días de la plantación por determinación de la masa fresca de las raíces tuberosas con peso superior a 115 g en el área de cálculo de las parcelas.

Tabla 4. Tratamientos estudiados a partir de la aplicación del biofertilizante a base de *Pseudomonas fluorescens* y diferentes dosis de fertilizante mineral con la fórmula completa NPK (9-13-17) en el rendimiento de *Ipomoea batatas* L. en suelo Pardo mullido carbonatado.

No.	Fórmula	Aporte			<i>Pseudomonas fluorescens</i> (20 l ha <sup>-1</sup> en sol. final 400 l ha <sup>-1</sup> )
	(9-13-17) (0.75 t ha <sup>-1</sup> )	N	P <sub>2</sub> O <sub>5</sub>	K <sub>2</sub> O	
1	Control	0	0	0	-
2	<i>P. fluorescens</i>	0	0	0	x
3	25%	16.9	24.4	31.9	x
4	50%	33.8	48.8	63.8	x
5	75%	50.6	73.1	95.6	x
6	100%	67.5	97.5	127.5	-

#### Procesamiento de los datos experimentales

Los diseños experimentales empleados y los análisis estadísticos realizados para el escalado fueron generados y ejecutados mediante software *Statistic Package for Social Science* (SPSS) versión XV- Centurión y Microsoft Excel para Windows en los experimentos de escalado. En las evaluaciones del biofertilizante en los diferentes cultivos una vez verificados los supuestos de normalidad y homogeneidad de varianza de los datos obtenidos (SPSS, versión 15.0, 2012) y transformada la variable porcentaje de brotación al  $\arcsen \text{ raíz } x/100$ , la información experimental se procesó estadísticamente como un diseño en Bloque al Azar. Se utilizó como criterio de comparación entre medias la Prueba de Tukey ( $p \leq 0.05$ ).

#### RESULTADOS Y DISCUSIÓN

##### Criterios para el escalado del proceso

El análisis de las relaciones adimensionales entre los fermentadores y el factor geométrico demostraron que no tenían similitud geométrica (Tabla 5) ya que no permanecían constantes con el paso de una escala a la otra. Por ello, se seleccionaron criterios para el escalado comprendidos en el método de la Regla del Pulgar cuya utilización no estuviese restringida a la condición de similitud geométrica según lo señalado por Anaya-Durand y Pedraza-Flores (2008) y San Juan *et al.* (2010).

Para el cálculo de la velocidad de agitación se seleccionó el criterio de velocidad en la punta del impelente (ND<sub>p</sub>) constante (Ec 2) y

para determinar el flujo de aire el criterio de velocidad superficial de gas ( $v_g$ ) constante (Ec 3).

Los valores estimados de velocidad de agitación y aireación para el escalado de la producción de *P. fluorescens* (Tabla 6) permitieron comprobar experimentalmente la cinética de crecimiento a partir de tener en cuenta las características de los fermentadores utilizados.

El valor de flujo de aire por unidad de volumen de medio constante obtenido se encuentra en el rango informado para la fermentación de bacterias (0.1-2.0 vvm) por otros autores (McNeal y Harvey, 2008).

##### Fermentación

##### 35 l de volumen efectivo

No se constató una fase de adaptación del microorganismo a las condiciones del cultivo (Figura 1). Se ha demostrado que si un cultivo exponencial se inocula en el mismo medio de cultivo y en condiciones similares, el crecimiento exponencial se inicia inmediatamente y se reduce el tiempo en la fase de latencia. La fase exponencial de crecimiento se desarrolló entre las dos y las diez horas de inoculado. La media de velocidad máxima de crecimiento ( $\mu_{\text{máx}}$ ) obtenida con las tres corridas de fermentación fue 0.1339 h<sup>-1</sup> con 95.8% de ajuste. Este valor de  $\mu_{\text{máx}}$  fue menor al referido para la fase de optimización del medio de cultivo para esta cepa (Pérez *et al.*, 2019). Para el género *Pseudomonas* es aceptable y comprendido entre 0.10-0.20 h<sup>-1</sup> tal y como lo expresado por Kulkarni (2002).

Tabla 5. Relaciones adimensionales entre dos fermentadores para el escalado de *Pseudomonas fluorescens*.

Relaciones Adimensionales	Fermentador	
	42 litros	500 litros
$H_T/D_T$	2.86	1.68
$H_L/D_T$	2.00	1.27
$D_T/D_i$	3.00	3.00
$H_L/D_i$	6.00	3.80
$D_i/L_i$	3.56	3.01
$D_i/A_i$	4.94	4.17
$F_G$	1.41	1.13

Leyenda:  $H_T$ , Altura del tanque,  $D_T$ , Diámetro del tanque,  $H_L$ , Altura del líquido,  $D_i$ , Diámetro del impelente,  $L_i$ , Alto del impelente,  $A_i$ , Ancho del impelente,  $F_G$  Factor geométrico

Tabla 6. Resultados de los criterios de escalado de la fermentación de *Pseudomonas fluorescens*.

Parámetros	Fermentador	
	42 litros	500 litros
Velocidad de agitación (N) (rpm)	749	266
Flujo de aire (Q) ( $l \text{ min}^{-1}$ )	13.33	105
Flujo de aire por unidad de volumen de medio constante (Q) (vvm)	0.44	0.30

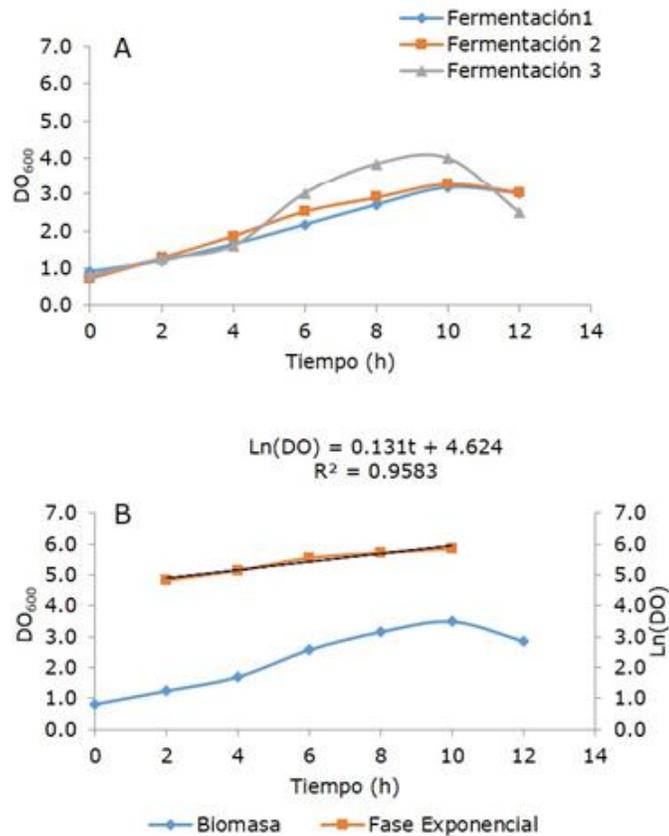


Figura 1. Curvas de crecimiento de *Pseudomonas fluorescens* en fermentador de 35 litros de volumen efectivo en condiciones de velocidad de agitación 749 rpm y flujo de aire 0.44 vvm. A) Tres fermentaciones, B) Curva promedio.

En cuanto a la viabilidad se obtuvo un promedio para las tres fermentaciones de  $1 \times 10^9$  UFC  $\text{ml}^{-1}$  a las 10 horas. Resultados similares fueron informados por Kamal *et al.* (2008) quienes cultivaron una cepa de *P. fluorescens* en caldo King B a  $28 \pm 2$  °C durante 48 h a 150 rpm, con un resultado final de  $9 \times 10^8$  UFC  $\text{ml}^{-1}$  y Arias (2012) que obtuvo en tres lotes valores que oscilaron entre  $1-5 \times 10^9$  UFC  $\text{ml}^{-1}$ .

350 l de volumen efectivo

En el proceso de escalado en el fermentador de 350 l de  $V_E$ , se apreció una fase de adaptación en las primeras dos horas del tiempo de fermentación (Figura 2). Este resultado se correspondió con el procedimiento utilizado para la preparación del inóculo en este estudio. Fue utilizado el producto de las fermentaciones de 42 l en su hora 11, donde se encontraba la bacteria en la fase de desaceleración o aceleración

negativa (Figura 1), que implica una disminución de la velocidad específica de crecimiento (inferior a la alcanzada en la fase exponencial de crecimiento). A nivel industrial se persigue mantener esta fase inicial lo más corta posible (Alí *et al.*, 2018).

La fase de crecimiento exponencial se extendió desde las cuatro hasta las doce horas. La media de  $\mu_{\text{máx}}$  fue de  $0.142 \text{ h}^{-1}$  con un 97.2% de ajuste. Estos valores de  $\mu_{\text{máx}}$  se correspondieron con los alcanzados en el fermentador de 35 l de  $V_E$  y encuentran comprendidos en el rango entre  $0.10-0.20 \text{ h}^{-1}$  obtenido por Kulkarni (2002) para el género *Pseudomonas*.

La viabilidad celular promedio en las tres fermentaciones a las 10 horas fue de  $4 \times 10^9$  UFC  $\text{ml}^{-1}$ . Este valor confirma un buen crecimiento celular entre  $1-5 \times 10^9$  UFC  $\text{ml}^{-1}$ , por lo que se puede afirmar que la cepa *P. fluorescens* respondió satisfactoriamente al escalado (Kamalet *al.*, 2008; Arias, 2012).

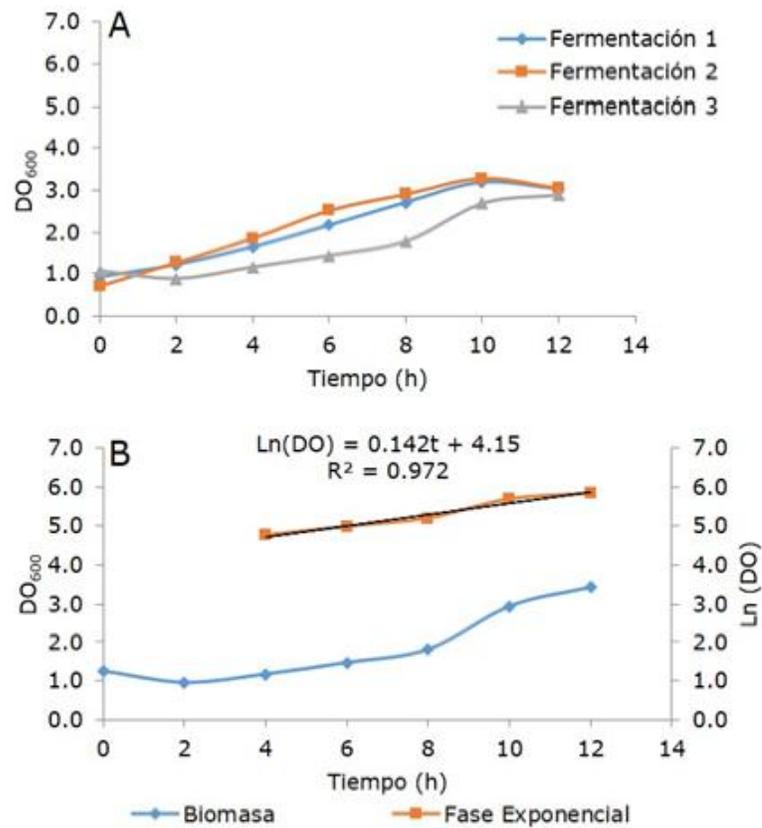


Figura 2. Curvas de crecimiento de *Pseudomonas fluorescens* en fermentador de 350 litros de volumen efectivo en condiciones de velocidad de agitación 266 rpm y flujo de aire 0.30 vvm. A) Tres fermentaciones, B) Curva promedio.

La comparación de las velocidades específicas de crecimiento de las fermentaciones mediante la prueba de Rangos Múltiples evidenció que no hubo diferencias significativas entre cualquier par de medias, con un 95% de confianza y se identificó un grupo homogéneo, según la alineación de X's en columna. El proceso de escalado es uno de los pasos más relevantes para la producción industrial de un microorganismo debido a que se requiere que se mantenga la misma productividad y eficiencia alcanzada en etapas previas. La selección adecuada de los criterios para el escalado debe involucrar variables que se impacten en funciones fisiológicas del microorganismo y se traduzcan en eficiencia del proceso (Srivasta, 2008; Alí *et al.*, 2018). Con 350 l de  $V_E$  fue posible reproducir los resultados obtenidos en las fermentaciones con 35 l de  $V_E$ . Los resultados corroboraron experimentalmente la validez de los criterios de escalado seleccionados. La combinación adecuada de aireación y agitación permite una mezcla adecuada de los nutrientes y su disponibilidad para los microorganismos y garantiza la transferencia de oxígeno (Alí *et al.*, 2018).

Evaluación del efecto del biofertilizante a base de *Pseudomonas fluorescens* sobre el crecimiento de plantas

La aplicación del biofertilizante a base de *P. fluorescens* obtenido en el proceso de escalado tuvo un efecto positivo sobre el crecimiento de las plantas donde se aplicó. De esta manera, las condiciones de fermentación garantizaron su actividad en la promoción del crecimiento vegetal.

#### Aclimatización de plantas *in vitro* de banano

En las evaluaciones a los 60 días de plantación en bolsas, se observó una respuesta positiva en el crecimiento de las plantas producidas *in vitro* (Figura 3). Resultaron visibles diferencias específicas en función de los tratamientos estudiados en las variables evaluadas.

Los resultados mostraron que la aplicación de este inoculante bacteriano incrementó los indicadores de crecimiento de las plantas en función del tiempo de aplicación. Los mayores valores para las variables altura de la planta, número de hojas, longitud del pecíolo y largo de la hoja No. 2 se obtuvieron con la inmersión de las raíces en el biofertilizante durante 15, 20 y 25 min (Tabla 7), sin diferencias significativas entre ellos. En el tratamiento de 20 min (T4) se encontraron las plantas con mayor ancho y largo de las hojas lo que se tradujo en un área foliar significativamente superior respecto a los demás tratamientos con 111.22 cm<sup>2</sup>. Estos resultados corroboran el efecto promotor del crecimiento de *P. fluorescens* en otros cultivos (Bach *et al.*, 1998). La producción de sustancias estimuladoras del crecimiento vegetal como auxinas, giberelinas y citoquininas, la protección contra organismos patógenos y favorecer la asimilación de nutrientes por las plantas se encuentran entre las actividades de promoción del crecimiento de las plantas que comparten muchas especies bacterianas (Vessey, 2003; Díaz-Blanco y Márquez-Reina, 2011; García-de-Salamone *et al.*, 2012).

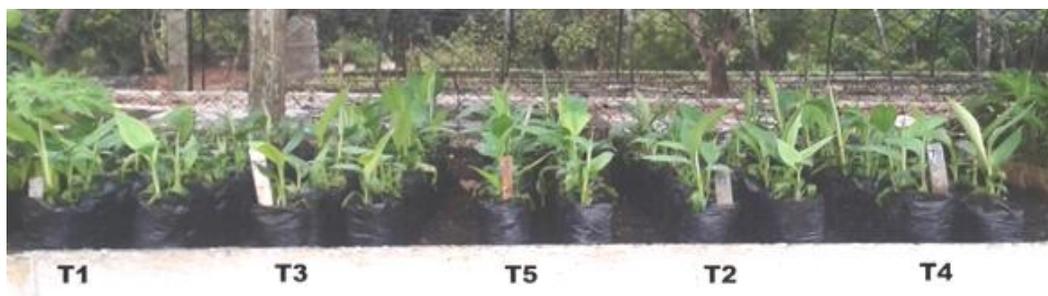


Figura 3. Plantas de banano cv. 'Manzano' (*Musa AAA*), obtenidas *in vitro* y tratadas con el biofertilizante a base de *Pseudomonas fluorescens*, después de 60 días en aclimatización. T1-control (sin aplicación), T2-T5 inmersión de raíces en solución del biofertilizante previo a la plantación. T2: 10 min, T3: 15 min, T4: 20 min, T5: 25 min.

*Cultivo de boniato (Ipomoea batatas L.) cultivar 'INIVIT B 2005'*

En las condiciones experimentales ensayadas la aplicación en el cultivo de boniato del biofertilizante de forma conjunta con el fertilizante químico produjo los mejores resultados.

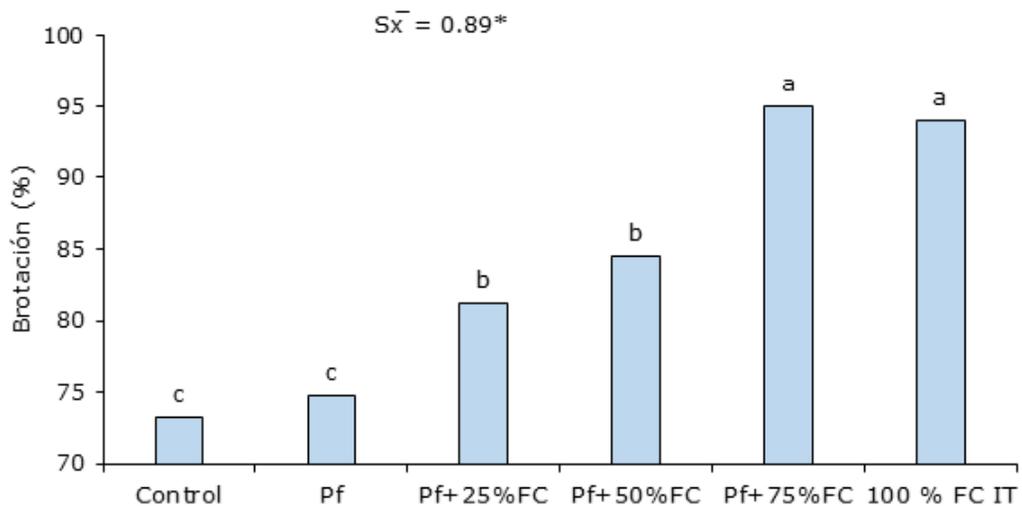
Los mayores porcentajes de brotación de los esquejes en los tratamientos donde se aplicó el biofertilizante se obtuvieron con la

aplicación conjunta de este y el 75% del fertilizante químico, sin diferencias significativas con el tratamiento que recibió la dosis mayor de fertilización (100% FC) (Figura 4). La brotación es un indicador que está en correspondencia con la calidad de la plantación y de este dependen los rendimientos relacionados con la producción. Asimismo, en un campo de boniato con un 90% de población en el momento de la cosecha, no se ven afectados el rendimiento y sus componentes (Singh *et al.*, 2018).

Tabla 7. Efecto en fase de aclimatación de biofertilizante a base de *Pseudomonas fluorescens* sobre el crecimiento de plantas *in vitro* de banano cv. 'Manzano' (*Musa AAA*).

TRAT.	ALTP (cm)	NHOJ (u)	LPEC (cm)	DHOJ2-3 (cm)	LHOJ2 (cm)	AHOJ2 (cm)	AF (cm <sup>2</sup> )
T1	18.63 b	1.27 b	1.79 c	3.06 c	14.23 c	6.27 b	72.14 c
T2	19.63 b	1.43 a	2.17 bc	4.15 ab	14.72 bc	6.39 b	75.79 bc
T3	21.27 a	1.55 a	2.49 ab	3.64 bc	15.97 ab	6.90 b	90.10 bc
T4	21.39 a	1.55 a	2.81 a	3.91 abc	17.61 a	7.85 a	111.22 a
T5	21.55 a	1.49 a	2.57 ab	4.56 a	16.16 ab	7.05 ab	91.82 b
S $\bar{x}$	0.34	0.03	0.10	0.23	0.42	0.22	4.85

Letras diferentes en cada columna expresan diferencias significativas ( $p \leq 0.05$ ) según la Prueba de Tukey. Leyenda: ALTP: altura de la planta, NHOJ: No. de hojas, LPEC: longitud del peciolo, LHOJ2: largo de la hoja No. 2, AHOJ2: ancho de la hoja No. 2, AF: área foliar, DHOJ2-3: distancia entre la hoja No. 2 y la No. 3, T1- control (sin aplicación), T2-T5 inmersión de raíces en solución del biofertilizante previo a la plantación. T2: 10 min, T3: 15 min, T4: 20 min, T5: 25 min



Letras diferentes sobre barras implican diferencias significativas según la prueba de Tukey para  $p \leq 0.05$ .

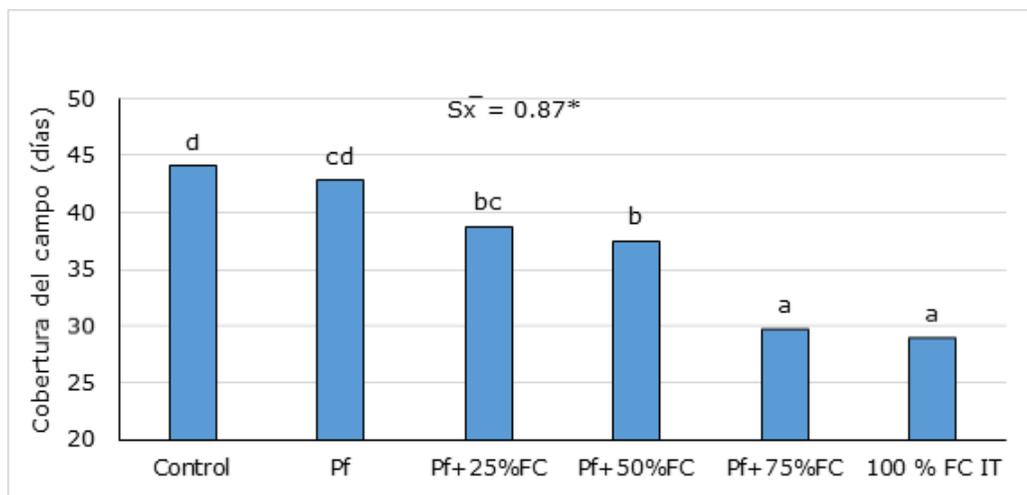
Figura 4. Brotación de esquejes de boniato (*Ipomoea batatas L.*) cv. 'INIVIT B 2005' a los 15 días de la plantación con aplicaciones conjuntas de biofertilizante a base de *Pseudomonas fluorescens* y diferentes dosis de fertilizante (NPK). 100% FC (NPK 9-13-17)0.75 t ha<sup>-1</sup>, P.f. = biofertilizante.

También en relación con el cierre del campo por el follaje (Figura 5), la mejor respuesta se apreció en el tratamiento con la aplicación conjunta biofertilizante y el 75% del fertilizante químico sin diferencias significativas con el tratamiento que recibió la dosis mayor de fertilización (100% FC) y sí con el resto de los tratamientos. Las mejores dosis produjeron un cierre de la plantación a los 29-30 días, lo que comparado con el tratamiento que no recibió fertilización se logró 14 días antes el cierre de plantación. La cobertura del campo por el follaje posee marcada influencia para evitar la aparición y desarrollo de arvenses, lo que reduce los costos y así contar con mayor producción de esquejes, es por ello que los productores de boniato prefieren una cobertura del campo más rápida lo que también garantiza un menor número de labores de cultivo (Dumbuya *et al.*, 2017).

En correspondencia con los resultados anteriores, los mayores rendimientos (Figura 5) se alcanzaron con la aplicación conjunta del biofertilizante y el 75% del fertilizante químico sin diferencias significativas con el tratamiento que recibió la dosis mayor de fertilización (100% FC) y sí con el resto de los tratamientos. Se logró disminuir en un 25% la dosis de fórmula completa recomendada por el Instructivo Técnico del cultivo del boniato. De forma similar, otros autores han

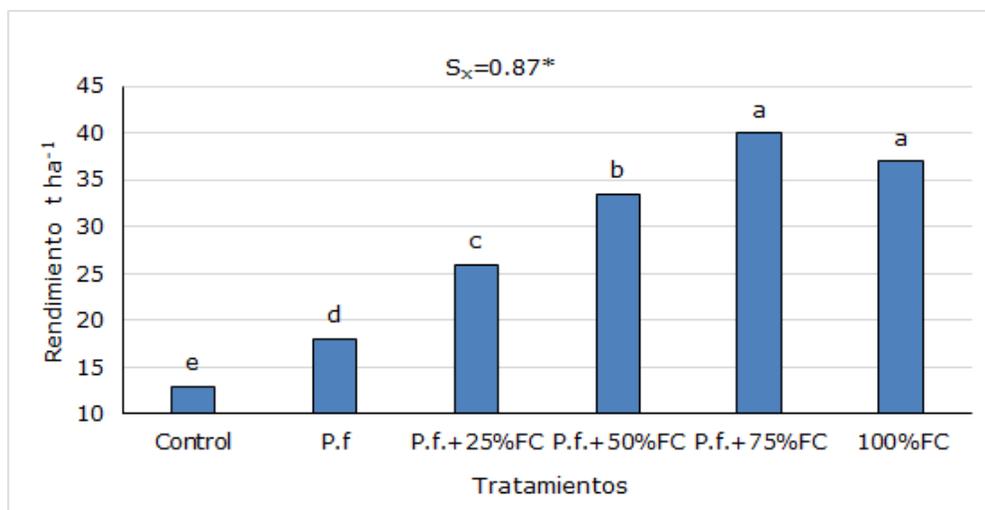
informado de resultados positivos con la utilización de bacterias solubilizadoras de fosfatos. En este sentido, Díaz-Blanco y Márquez-Reina (2011) señalaron la reducción de la aplicación en un 50% del fósforo en los cultivos considerando el nivel medio de fósforo asimilable en los suelos después de las prácticas de mejoramiento de suelos entre las que se encontraba la aplicación de bacterias promotoras del crecimiento vegetal lo que conllevó a que se fertilizaran todos los cultivos tratados, con un 50% menos del  $P_2O_5$  recomendado para cada caso en particular.

Los efectos positivos de la inoculación con el biofertilizante en presencia de la dosis del 75% de la fertilización se obtuvieron tanto en la brotación y cierre del campo como en el rendimiento, lo cual garantizó una disminución del 25% de las aplicaciones de fertilizantes minerales. Ello coincidió con lo expresado por Aguado-Santacruz (2012), en cuanto a que los biofertilizantes permiten incrementar el valor agregado y rendimiento de los cultivos de 17% a 50%, mejoran la fertilidad del suelo y reducen las poblaciones de microorganismos nocivos para los cultivos. En este sentido, diferentes autores han referido el efecto beneficioso de *P. fluorescens* sobre numerosos cultivos en los cuales produjo un incremento en la biomasa y el rendimiento, redujo la incidencia de organismos patógenos, mejoró



Letras diferentes sobre barras implican diferencias significativas según la prueba de Tukey para  $p \leq 0.05$

Figura 5. Tiempo de cultivo para la cobertura de campo por el follaje de plantas de boniato (*Ipomoea batatas* L.) cv. 'INIVIT B 2005' en suelo Pardo mullido carbonatado con aplicaciones conjuntas de biofertilizante a base de *Pseudomonas fluorescens* y diferentes dosis de fertilizante (NPK) a los 25 días de la plantación. 100% FC (NPK 9-13-17),  $0.75 \text{ t ha}^{-1}$ , P.f. = biofertilizante-Pf.



Letras diferentes sobre barras implican diferencias significativas según la prueba de Tukey para  $p \leq 0.05$

Figura 6. Efecto de las aplicaciones conjuntas de *Pseudomonas fluorescens* y diferentes dosis de fertilizante (NPK) en el rendimiento evaluado a los 135 días de la plantación del cultivar de boniato 'INIVIT B 2005' en suelo Pardo mullido carbonatado. Fecha de plantación: 20-01-2019. 100% FC (9-13-17) = 0.75 t ha<sup>-1</sup>, P.f. = *Pseudomonas fluorescens*.

la viabilidad de las raíces, la concentración de carbohidratos en estas, así como el crecimiento de las plantas (Meena *et al.*, 2002; García-de-Salamone *et al.*, 2012; Qin *et al.*, 2016).

La producción de biofertilizantes requiere del conocimiento de la fisiología de plantas y de los microorganismos, también enfrenta desafíos tecnológicos como el proceso de fermentación, el tipo de formulaciones, la población de microorganismos y su sistema de liberación. El desarrollo de una formulación estable es posible mediante la combinación de conocimientos de aspectos microbianos y técnicos (Stamenković *et al.*, 2018). En correspondencia con lo anterior, en este trabajo mediante los parámetros de fermentación en un volumen de 500 l con 350 l de V<sub>E</sub>, velocidad de agitación de 266 rpm y flujo de aire de 105 l min<sup>-1</sup> se alcanzó el escalado de la producción de un biofertilizante a base de *P. fluorescens* que permitirá su producción industrial y su uso agrícola.

## CONCLUSIONES

La producción de un biofertilizante a base de *Pseudomonas fluorescens* puede llevarse a cabo en un fermentador de tanque agitado de 500 l (volumen efectivo de 350 l) durante 12 h con velocidad de agitación de 266 rpm y flujo de aire de 105 l min<sup>-1</sup> lo cual garantiza

su concentración de 1x10<sup>9</sup> UFC ml<sup>-1</sup> y su efecto promotor del crecimiento en plantas.

## AGRADECIMIENTOS

Los autores desean agradecer a la Unidad de Desarrollo e Investigación de LABIOFAM, a la Facultad de Ingeniería Química de la Universidad Tecnológica de la Habana y al Fondo Financiero de Ciencia e Innovación (FONCI). Los financistas no tuvieron participación en el diseño del estudio, la colecta y análisis de los datos, la decisión de publicar o la preparación del manuscrito.

## Conflictos de interés

Los autores no declaran conflictos de interés.

## Contribución de los autores

Conceptualización MCPP, JOG y EASV, Metodología escalado MCPP, JOG y YRT, Validación escalado JOG y YRT, Investigación MCPP, JOG y JVP, Metodología de validación del biofertilizantes YBG y JSG, Supervisión MCPP y EASV, Recursos MCPP y JOG, Escritura – primera redacción MCPP, JOG y EASV, YRT, Escritura - revisión y edición MCPP.

## REFERENCIAS

Aiba S, Humprey AE, Millis N (1973) Biochemical Engineering. Academic Press, New York

- Alí S, Faiq A, Sameer M, Rafique Z (2018) A Review Scale Up Fermentation Procedure. *Int J S Res Sci Tech* (4)5: 1301-1307
- Anaya-Durand A, Pedraza-Flores H (2008) Escalamiento, el arte de la ingeniería química, Plantas pilotos, el paso entre el huevo y la gallina. *Tecnología Ciencia Educación (IMIQ)* 23(1): 31-39
- Aguado-Santacruz GA (2012) Introducción al Uso y Manejo de los Biofertilizantes en la Agricultura. INIFAP/ SAGARPA, México
- Arias M (2012) Desarrollo de un Sistema de entrega líquido para *Pseudomonas fluorescens* PF14. Trabajo de Grado, Pontificia Universidad Javeriana Facultad de Ciencias, Bogotá, Colombia
- Bach T, Martínez E, Sarría M, Grimón N, Guzmán A (1998) Efectos de la aplicación de una rizobacteria fosfolubilizadora sobre algunos índices de crecimiento del cultivo del maíz, Resúmenes del III Encuentro Latinoamericano de Biotecnología Vegetal. REDBIO, La Habana
- Bach T (2002) Fosforina, ¿solo una alternativa para la fertilización fosfórica? *Agricultura orgánica* 2: 31-32
- Díaz-Blanco P, Márquez-Reina E (2011) Validación de los biofertilizantes *Azotobacter*, *Rhizobium* y Fosforina en cuatro sistemas de cultivos en condiciones de producción. *Revista Avances* 13(2): 1-9
- Dunn IJ, Heinzle E, Ingham J, Prenosil JE (2003) *Biological Reaction Engineering*. WILEY-VCH GmbH & Co, London
- Dumbuya G, Sarkodie-Addo J, Daramy MA, Jalloh M (2017) Effect of vine cutting length and potassium fertilizer rates on sweet potato growth and yield components. *Int J Agric For* 7(4): 88-94
- García-de-Salamone IE, Funes JM, Di Salvo LP, Escobar-Ortega JS, D'Auria F, Farrando L, Fernandez-Scavino A (2012) Inoculation of paddy rice with *Azospirillum brasilense* and *Pseudomonas fluorescens*: Impact of plant genotypes on rhizosphere microbial communities and field crop production. *Appl Soil Ecol* 61: 196-204; doi: 10.1016/j.apsoil.2011.12.012
- Guerra G, Izurieta B, Páez MA (2009) Escalado de la producción industrial de levadura de panificación usando dos reactores modelo y un biorreactor prototipo. *Revista Politécnica* 30(1): 1-9
- Hernández A, Pérez J, Bosch D, Castro N (2015) Clasificación de los suelos de Cuba 2015. Ediciones INCA, Mayabeque
- INIVIT (2012) Instructivo Técnico para la producción de Viandas, Producción de semillas. Editorial INIVIT, La Habana; ISBN: 978-959-295-006-1
- Kamal M, Elyours A, Hendawy E (2008) Integration of *Pseudomonas fluorescens* and acibenzolar-S-methyl to control bacterial spot disease of tomato. *Crop protection* 27: 1118 -1124
- Kulkarni N (2002) Studies on lipase enzyme from *Pseudomonas fluorescens* NS2W. Thesis of doctor of Philosophy in Microbiology, University of Pune, Maharashtra, India
- Londoño L (2007) Evaluación y escalamiento de la producción de levaduras nativas tipo *Saccharomyces* spp. a nivel de laboratorio. Universidad EAFIT, Medellín
- Martínez F, García C, Gómez L, Aguilar Y, Martínez-Viera R, Castellanos N, Riverol M (2017) Manejo sostenible de suelos en la Agricultura Cubana. *Agroecología* 12(1): 25-38
- Meena B, Radhajeyalakshmi R, Marimuthu T, Vidhyasekaran P, Velazhahan R (2002) Biological control of groundnut late leaf spot and rust by seed and foliar applications of a powder formulation of *Pseudomonas fluorescens*. *Biocontrol Sci Technol* 12(2): 195-204; doi: 10.1080/09583150120124450
- McNeal B, Harvey L (2008) *Practical Fermentation Technology*. John Wiley & Sons, West Sussex
- Miller G (1959) Use of Dinitrosalicilic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar. *Analytical Chemistry* 31: 426-428
- Nuñez DB, Liriano R, Álvarez JL, Walker Y, Candelario Y (2013) Resultados de la aplicación de biofertilizantes a base de *Azospirillum* y micorrizas en asociaciones de

- cultivos hortícolas en condiciones de semiprotegido. Centro Agrícola 40(1): 23-38
- Olivares BTN (2010) Diseño y escalamiento de procesos biotecnológicos, Apuntes impresos. Universidad Autónoma de Baja California UAdB, México
- Pérez UFJ (2016) Escalado de una torre de Absorción. Universidad de Sevilla, Sevilla
- Pérez MC, Oramas J, Sotolongo EA, Miranda A, Román Y, González A (2019) Optimización del medio de cultivo y las condiciones de fermentación para la producción de un biofertilizante a base de *Pseudomonas fluorescens*. Biotecnología Vegetal 19(2): 127-138
- Qin S, Zhou W, Li Z, Lyu D (2016) Effects of rhizobacteria on the respiration and growth of *Cerasus chalinensis* Kom. seedlings. Span J Agric Res 14(2): e0803; doi: 10.5424/sjar/2016142-6848
- Quintero R (1993) Ingeniería Bioquímica Teoría y Aplicaciones. Alhambra Mexicana, DF México
- Rojas-Solís D, Contreras-Pérez M, Santoyo G (2013) Mecanismos de estimulación del crecimiento vegetal en bacterias del género *Bacillus*. Revista Biológicas 15(2): 36-41
- Ruiz A, Alvarez H (2011) Escalamiento de Procesos Químicos y Bioquímicos basado en un modelo Fenomenológico. Información Tecnológica 22(6): 33-52
- San Juan A, Pérez J, Borges D, Gómez E, Pérez M, Guevara Y, Serrano J, Pérez J, Oliva L, Martínez J, Saura G, Pérez J, Lorenzo M (2010) Escalado de producción en la planta de bioproducto Cuba -10. Dirección de Bioprocesos CUBA-10 IPN, Quivicán
- Singh J, Sharma MK, Singh SP, Bano R, Mahawar AK (2018) Effect of organic and inorganic sources of NPK and bio-fertilizer on enhancement of growth attributes and chlorophyll content of sweet potato. Int J Curr Microbiol App Sci 7(9): 3659-3667
- Srivasta ML (2008) Fermentation Technology. Alpha Science publisher, Oxford
- Stamenković S, Beškoski V, Karabegović I, Lazić M, Nikolić N (2018) Microbial fertilizers: A comprehensive review of current findings and future perspectives. Spanish Journal of Agricultural Research 16(1): e09R01; doi: 10.5424/sjar/2018161-12117
- Vessey JK (2003) Plant growth promoting rhizobacteria as biofertilizers. Plant and Soil 255: 571-86

Recibido: 03-07-2020

Aceptado: 15-09-2020

Este es un artículo de acceso abierto distribuido bajo una Licencia Creative Commons Atribución-NoComercial 4.0 Internacional (CC BY-NC 4.0) <https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/> Está permitido su uso, distribución o reproducción citando la fuente original y los autores.