



**Optimización del proceso de producción de un
bioinoculante con base en
Bacillus subtilis EA-CB0575**

Yessica Alejandra Montoya Giraldo

Universidad EAFIT
Escuela de Ingeniería
Departamento de Ingeniería de Procesos
Medellín, Colombia
2016

Optimización del proceso de producción de un bioinoculante con base en *Bacillus subtilis* EA-CB0575

Yessica Alejandra Montoya Giraldo

Tesis presentada como requisito parcial para optar al título de:
Ingeniera de procesos

Asesora:

Ruth Natalia Moncada Ossa
Ingeniera de procesos. MSc. Ingeniería

Coasesora:

Luisa Fernanda Posada Uribe
Ingeniera de procesos. MSc. PhD(c) Biotecnología

Universidad EAFIT
Escuela de Ingeniería
Departamento de Ingeniería de Procesos
Medellín, Colombia
2016

Agradecimientos

En primer lugar, agradezco a mi asesora Natalia Moncada Ossa por su acompañamiento, dedicación y apoyo durante todo el desarrollo del proyecto; y a mi coasesora Luisa Posada Uribe por su disposición permanente y positiva para ayudarme a resolver las dificultades que se iban presentando. Muchas gracias a ambas por su apoyo incondicional, la motivación constante que me daban para lograrlo, por el conocimiento que transmitieron hacia mí y por las enseñanzas académicas que no dudaron en confiarme en tan poco tiempo.

Agradezco a Jaime Andrés Gutiérrez por encaminarme para la realización de este proyecto y a Valeska Villegas por permitirme hacer parte de él.

Quisiera también dar mis agradecimientos a Sigifredo Cárdenas, técnico del laboratorio de Biotecnología por ayudarme en la realización de todos mis ensayos, y a Jhon Jairo Estrada, técnico de laboratorio de procesos y Edgar Darío Arbelaez, Coordinador de laboratorios de Ingeniería de Procesos, por facilitarme los materiales y equipos necesario para el desarrollo de los ensayos.

Finalmente, quiero dar gracias infinitas a mis padres, hermanas y novio por estar a mi lado durante todo este tiempo. Gracias por su paciencia, comprensión y apoyo constante, ustedes fueron, han sido y serán primordiales no sólo en este, si no en todos mis logros.

Resumen

Con el fin de reducir los efectos negativos generados por el uso de productos químicos en la agricultura, se han desarrollado insumos biológicos como el planteado por la Universidad EAFIT y AUGURA (Asociación de Bananeros de Colombia), un bioinoculante cuyo ingrediente activo es la cepa *Bacillus subtilis* EA-CB0575 aislada en el Urabá Antioqueño. Para estandarizar las etapas de producción de este producto se realizó un protocolo para detallar la etapa de granulación. Adicionalmente, se optimizaron las condiciones de operación de la mezcladora y el secador, mediante el uso de diseños estadísticos de superficie de respuesta (CCD y Box-Behnken). Los valores óptimos hallados para la mezcladora fueron 133 rpm como velocidad de mezclado y 46 minutos en el tiempo de mezclado; mientras que para el secador fue una velocidad de 2.03 m/s, un tiempo de secado de 33 minutos y una temperatura de 46.2°C. Estos valores se validaron con dos réplicas en diferentes tiempos teniendo como porcentaje de error 11% y 4.35%, respectivamente. Finalmente, se midieron cuatro propiedades fisicoquímicas del producto optimizado, siguiendo las metodologías planteadas en las Normas Técnicas Colombianas (NTC 439, 5527) y las especificaciones de la resolución 698 (2011) determinadas por el ICA. Como resultados se obtuvo un producto que cumple con los criterios de aceptación de dichas propiedades, teniendo una humectabilidad de 1 segundo, una suspensibilidad de 95.14%, un pH de 8.345 y una estabilidad de la bacteria con un porcentaje de error del 0.042% entre los valores de viabilidad logrados en cada mes de evaluación (16 meses en total), teniendo una viabilidad promedio de 9.422 Log(UFC/g). Con estos resultados el proceso de producción es promisorio para su comercialización.

Palabras clave: *Bacillus subtilis* EA-CB0575, optimización de las condiciones de operación, humectabilidad, suspensibilidad, pH, estabilidad del ingrediente activo, Normas Técnicas Colombianas (NTC)

Abstract

There are some biological supplies which have been developed, with the aim of reducing the negative effects generated by the use of chemical products in agriculture. An example of this is a Bio-inoculant developed by EAFIT University and AUGURA (Asociación de Bananeros de Colombia) which active ingredient is the strain *Bacillus subtilis* EA-CB0575. In order to achieve the standardization of the stages of production a protocol in this thesis for a detailed explanation on how to proceed with the granulation stage was developed. Additionally, the operational conditions of both mixer and dryer were optimized, through the use of statistical designs of Response Surface (CCD y Box-Bhenken). The optimal values found for the mixer were 133 rpm of mixing speed and 46 minutes of mixing time. The values produced for the dryer were a speed of 2.03 m/s, 33 minutes of drying time and a temperature of 46.2°C. These optimal values were validated in two repetitions, at different times, with an error rate of 11% y 4.35%, respectively. Finally, the wettability, pH, suspensibility and stability of the bio-inoculant's active ingredient were measured by following the methodologies posed on the Colombian Technic Regulations (Normas Técnicas Colombianas – NTC 439, 5527), and the ICA's specifications of the 698 (2011) resolution. The results showed that the product met the criterion of acceptability: 1 second of wettability, 95.14% of suspensibility, a pH of 8.345 and an acceptable stability of the bacterial population measured every month over time (16 months) with an error rate of 0,042% (16 months in total). The average of viability was 9.422 Log (UFC/g). With this results, the product is promissory for its commercialization.

Key words: *Bacillus subtilis* EA-CB0575, optimization of operation conditions, wettability, suspensibility, pH, stability of active ingredient, Normas Técnicas Colombianas (NTC).

Contenido

Contenido

Resumen.....	V
Abstract.....	VI
Contenido.....	VII
Lista de figuras.....	IX
Lista de tablas.....	X
Lista de anexos.....	XI
Introducción.....	15
Objetivos.....	17
Capítulo I: Marco Teórico.....	18
1.1 Inoculantes biológicos.....	18
1.2 Formulaciones.....	19
1.2.1 Formulaciones granulares.....	21
1.2.2 Antecedentes de formulaciones biológicas granulares.....	23
1.3 <i>B. subtilis</i> como principio activo.....	25
1.3.1 <i>B. subtilis</i> EA-CB0575.....	27
1.4 Normas Técnicas Colombianas para insumos biológicos aplicados a la agricultura.....	28
Capítulo II: Optimización de las etapas de mezclado y secado del proceso productivo de un bioinoculante con base en <i>Bacillus subtilis</i> EA-CB0575.....	31
Resumen.....	31
2.1 Introducción.....	32
2.2 Materiales y métodos.....	33
2.2.1 Producción de la suspensión bacteriana.....	33
2.2.2 Preparación del material sólido.....	34
2.2.3 Proceso de mezclado.....	34

2.2.4	Proceso de secado	35
2.2.5	Validación de la optimización de los equipos	37
2.2.6	Diseño de experimentos y análisis estadístico	37
2.3	Resultados	38
2.3.1	Optimización de las condiciones de operación de la mezcladora Actum modelo AML 1000	38
2.3.2	Optimización de las condiciones de operación del secador de lecho fluidizado Sherwood Scientific	42
2.3.3	Validación de los valores optimizados en las etapas de mezclado y secado 46	
2.4	Conclusiones.....	47
Capítulo III: Evaluación de parámetros exigidos por la normatividad colombiana para la comercialización de un bioinoculante con base en <i>B. subtilis</i> EA-CB0575		48
Resumen		48
3.1	Introducción.....	49
3.2	Materiales y métodos	50
3.2.1	Evaluación de la humectabilidad de un bioinoculante con base en <i>B. subtilis</i> EA-CB0575	50
3.2.2	Medición del pH de un bioinoculante con base en <i>B. subtilis</i> EA-CB0575	50
3.2.3	Evaluación de la suspensibilidad de un bioinoculante con base en <i>B. subtilis</i> EA-CB0575	51
3.2.4	Seguimiento de la viabilidad del ingrediente activo de un bioinoculante con base en <i>B. subtilis</i> EA-CB0575.....	52
3.3	Resultados	52
3.3.1	Humectabilidad	52
3.3.2	Suspensibilidad	53
3.3.3	pH	54
3.3.4	Viabilidad	54
3.4	Conclusión	55
Capítulo IV Conclusiones y recomendaciones.....		57
4.1	Conclusiones.....	57
4.2	Recomendaciones.....	58
Anexos		59
Bibliografía		103

Lista de Figuras

Lista de figuras

Ilustración 1. Superficie de respuesta para la optimización de la viabilidad promedio.....	41
Ilustración 2. Superficie de respuesta de la deseabilidad	45
Ilustración 3. Evaluación de la estabilidad de un bioinoculante con base en <i>B. subtilis</i> EA-CB0575 por 16 meses	55

Lista de tablas

Tabla 1. Bioinsumos comerciales más reconocidos, producidos en diferentes países....	24
Tabla 2. Normas Técnicas Colombianas (NTC) y sus especificaciones	29
Tabla 3. Diseño CCD para la optimización de las condiciones de operación de la mezcladora Actum.....	35
Tabla 4. Diseño Box-Behnken para optimizar las condiciones de operación del secador Sherwood Scientific.....	36
Tabla 5. Resultados de la optimización de la mezcladora Actum	39
Tabla 6. Resultados de la optimización del secador Sherwood Scientific	43

Lista de Anexos

Lista de anexos

Anexo A Protocolo de mezcla de sólidos para la producción de un bioinoculante con base en <i>B. subtilis</i> EA-CB0575	45
Anexos B. Proceso de granulación para la producción de un bioinoculante con base en <i>B. subtilis</i> EA-CB0575	54
Anexos C. Proceso de secado para la producción de un bioinoculante con base en <i>B. subtilis</i> EA-CB0575	62
Anexos D. Resultados de la optimización de la mezcladora	65
Anexos E. Resultados de la optimización del secador	67
Anexos F. Protocolo del ensayo de humectabilidad para un bioinoculante base pesta con <i>B. subtilis</i> EA-CB0575 como ingrediente activo	74
Anexos G. Determinación de pH para la producción de un bioinoculante con base en <i>B. subtilis</i> EA-CB0575	78
Anexos H. Protocolo del ensayo de suspensibilidad para la producción de un bioinoculante con base en <i>B. subtilis</i> EA-CB0575	82

Lista de abreviaturas

Abreviatura Término

<i>G</i>	Gramos
<i>mL</i>	Volumen en mililitros
<i>TSB</i>	Caldo Tripticasa de Soya
<i>TSA</i>	Agar Tripticasa de Soya
<i>SBM</i>	“Sporulation Bacillus Medium”
<i>UFC/mL</i>	Unidades formadoras de colonia por mililitro
<i>Log(UFC/g)</i>	Logaritmo de unidades formadoras de colonia por gramo
<i>CIPAC</i>	Collaborative international Pesticide Analytical Council Limited
<i>FAO</i>	Organización de las Naciones Unidas para la alimentación y la agricultura
<i>ICA</i>	Instituto Colombiano Agropecuario
<i>CCD</i>	Central Composite Design
<i>T</i>	Tiempo
<i>T</i>	Temperatura
<i>V</i>	Velocidad

Lista de Abreviaturas

Abreviatura Término

<i>NTC</i>	Norma Técnica Colombiana
<i>Psig</i>	Unidad de presión
<i>WG</i>	Gránulo mojable (inglés)
<i>MSR</i>	Metodología de superficie de respuesta
<i>pH</i>	Valor de acidez-basicidad de una sustancia
<i>rpm</i>	Revoluciones por minute
<i>PGPR</i>	“Plant Growth Promoting Rhizobacteria”
<i>ANOVA</i>	Análisis de varianza

Introducción

El uso excesivo de los insumos químicos y las constantes cosechas sin darle un tiempo prudente de recuperación al suelo produce una disminución en la fertilidad del mismo, lo cual trae como consecuencias principales la baja productividad de los cultivos y la aparición de problemáticas sociales y ambientales (Altuhaish, 2014). Para reducir el uso de los agroquímicos se han introducido en el mercado fertilizantes biológicos, definidos como sustancias que contienen una o más cepas de microorganismos que actúan por lo general en la rizósfera, zona más próxima a las raíces de las plantas, para promover su crecimiento e inhibir la presencia de patógenos en éstas, como lo son las bacterias PGPR (Del inglés "Plant Growth Promoting Rhizobacteria") entre las cuales se mencionan los géneros *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Azospirillum*, *Rhizobium* y *Serratia*. (Vessey, 2003).

Bacillus subtilis es una bacteria Gram positiva perteneciente al género *Bacillus*, la cual ha sido usada desde finales del siglo XIX para diversos propósitos como la biodosimetría la cual sirve para verificar la eficiencia de autoclaves y desinfectantes, para el desarrollo de armas biológicas y para productos de limpieza del hogar. Sin embargo, en los últimos años esta bacteria ha sido de gran interés debido a su alta producción de metabolitos secundarios y especialmente por la capacidad de generar esporas, cualidades que permiten crear productos más duraderos para el beneficio animal, vegetal y humano, tales como los probióticos, insecticidas e inoculantes naturales (Cartman & La Ragione, 2004).

Para la conservación y estabilidad de estos microorganismos durante la producción, almacenamiento y uso del producto se debe desarrollar una formulación que contenga los adyuvantes y diluyentes adecuados para que el producto cumpla con el objetivo determinado, el cual es estimular el crecimiento de las plantas. Estas formulaciones se clasifican en productos secos como los gránulos, polvos, pellets, briquetas y cápsulas, y

suspensiones líquidas entre las que se puede mencionar emulsiones y formulaciones encapsuladas (Burges, 1998).

Las formulaciones granulares se dan mediante la unión de varias partículas pequeñas que al aglomerarse forman sólidos de mayor tamaño. Esto se logra aplicando uno de los métodos definidos para este proceso: la compactación. Dicho proceso se divide en vía seca (se usa la presión de sólidos) o vía húmeda (se lleva a cabo la extrusión de una masa conformada por los componentes de la formulación) (Kadam, 1990). Las principales etapas de la compactación por vía húmeda son la mezcla, para homogenizar todos los componentes de la formulación (Shenoy & Innings, 2015); la extrusión, para darle forma a la masa húmeda (Kadam, 1990); y el secado, para reducir el contenido de líquido de los gránulos obtenidos y así prolongar su vida útil (Geankoplis, 1998).

Desde el año 2007 la Universidad EAFIT junto con AUGURA (Asociación de Bananeros de Colombia) desarrollaron un bioinoculante basado en la cepa *Bacillus subtilis* EA-CB0575, la cual fue aislada de la rizósfera de una planta de banano en el Urabá Antioqueño, Colombia por Ramírez (2012). Aunque el medio con el que se logra un crecimiento y porcentaje de esporulación de estas bacterias ya fue diseñado y optimizado, (Posada, Romero, & Villegas, 2015) y las etapas del proceso ya han sido definidas (Gutiérrez, 2014), se vio la necesidad de estandarizar su proceso productivo y optimizar dos de las etapas que hacen parte de éste, con lo que se logra mejorar la calidad del producto y cumplir con los requisitos para su posible comercialización lo que generará un valor agregado que es el beneficio económico.

Por tal motivo, en este trabajo se optimizaron las condiciones de operación de la mezcladora y el secador empleados en el proceso. Además se estandarizó la etapa de granulación mediante el desarrollo de un protocolo donde se da información específica de cómo manejar el equipo para extruir la masa húmeda. Y finalmente, se midió la humectabilidad, suspensibilidad, pH y estabilidad del producto optimizado para verificar que dichas propiedades cumplieran con los estándares estipulados en las Normas Técnicas Colombianas (NTC).

Objetivos

General

Optimizar las etapas de mezclado y secado del proceso de producción de un bioinoculante con base en *Bacillus subtilis* EA-CB0575.

Específicos

- Establecer las condiciones del proceso de granulación de un bioinoculante a base de *B. subtilis* EA-CB0575.
- Determinar las condiciones óptimas de operación de la etapa de mezclado y secado del proceso de producción de un bioinoculante con base en *B. subtilis* EA-CB0575.
- Evaluar algunos parámetros exigidos por las normas ICONTEC Colombia para bioinsumos, al bioinoculante optimizado.

Capítulo I: Marco Teórico

1.1 Inoculantes biológicos

Los fertilizantes y pesticidas hacen parte de los insumos químicos usados en la agricultura desde principios del Siglo XX (Lyuri, 2008), con el fin de reforzar los micro y macro nutrientes requeridos para el desarrollo vegetal de los cultivos y protegerlos de plagas que les impiden tener un buen rendimiento (Liu & Pan, 2014). El uso de estos productos aumenta en la medida que la población también lo hace para suplir las necesidades humanas, causando problemas ambientales como erosión, eutrofización, contaminación en el aire (Roy, Finck, & Blair, 2006), y problemas de salud pública derivados de la presencia de contaminantes en las fuentes de agua y en los alimentos cultivados que, posteriormente son consumidos por los animales y los seres humanos. Adicionalmente, durante la producción de los fertilizantes se genera el dióxido de carbono y el óxido nitroso, dos gases que al estar en altas concentraciones en el ambiente puede afectar la salud de las personas (Yara, 2012).

Con el objetivo de contrarrestar los efectos negativos causados por los agroquímicos, se han desarrollado productos de origen biológico u orgánico para la agricultura denominados bioinsumos, los cuales tienen como principio activo microorganismos benéficos o extractos naturales (Baquero & Tobar, 2007). Algunos de estos productos son los inoculantes biológicos, bioabonos, extractos vegetales, bioquímicos y agentes biológicos para el control de plagas (ICA, 2011).

Capítulo I

Los inoculantes biológicos son aquellas sustancias que contienen una o más cepas de microorganismos que al aplicarse en el suelo o en semillas, promueven el crecimiento de las plantas, mejoran la disponibilidad de sus nutrientes, da mayor fertilidad a los suelos y permite un mejor enraizamiento de las plantas (Altuhaish, 2014). La mayoría de estos microorganismos actúan desde la rizósfera de la planta, zona del suelo adyacente a la raíz donde existe una alta actividad biológica debido a la influencia por los exudados radiculares (Toro & Garcés, 2009). Dentro del grupo de los bioinoculantes se encuentran las bacterias simbióticas y asimbióticas fijadoras de nitrógeno, hongos micorrizógenos, microorganismos solubilizadores de fosfato, promotores de crecimiento vegetal y transformadores de materia orgánica (ICA, 2011).

En el grupo de los microorganismos promotores de crecimiento vegetal están las PGPR, bacterias que se encuentran en la rizósfera de la planta (Vessey, 2003). Sus dos tipos de mecanismos de acción para promover el crecimiento vegetal son: los directos, por medio del cual las rizobacterias ayudan a la toma de nutrientes en la planta y mejoran su nutrición; y los métodos indirectos, los cuales se basan en la producción de sustancias o la competencia, que inhiben el desarrollo de patógenos (Celis & Gallardo, 2008). Para conservar la estabilidad, eficiencia y evitar la degradación de los microorganismos que están como ingrediente activo en los productos biológicos durante el almacenamiento, transporte y uso de éstos, es necesario el desarrollo de una formulación adecuada y específica para cada uno, teniendo presente también el aspecto económico para facilitar su comercialización (Burges, 1998).

1.2 Formulaciones

La formulación de bioproductos es un proceso de múltiples etapas donde una o varias cepas del microorganismo quedan contenidas en la mezcla de vehículo o "carrier", que constituye la mayor porción del producto y una serie de adyuvantes o aditivos (Herrmann, 2013). Sus principales funciones son darle estabilidad al ingrediente activo durante la producción, almacenamiento y distribución del producto; facilitar el uso y la aplicación del producto en el campo; proteger el microorganismo o ingrediente activo de condiciones ambientales adversas y mantener su eficiencia (Burges, 1998).

Los principales pasos para lograr una formulación correcta son elegir el microorganismo o principio activo de tal manera que cumpla con el objetivo deseado bajo las condiciones

ambientales y geográficas del lugar donde será aplicado (Stephens & Rask, 2000); diseñar y optimizar el medio de cultivo adecuado para el principio activo elegido con la finalidad de aumentar su producción (Burges, 1998); recuperar la biomasa obtenida de la fermentación, ya sea por filtración, centrifugación o precipitación (Bravo & Ceron, 2004); determinar el diluyente y los aditivos apropiados que garanticen viabilidad, inocuidad, estabilidad y facilidad de aplicación de la formulación, sin afectar la salud del agricultor y reduciendo en lo posible actividades adicionales para el agro (Bashan & Bashan, 2013); procesar los ingredientes según el tipo de formulación deseada y por último, envasar el producto final usando los materiales aptos para su conservación (Jin & Grigas, 1998).

Las formulaciones pueden clasificarse en dos grupos, productos secos y suspensiones líquidas. Dentro de los productos secos están incluidos los polvos, gránulos, briquetas, cápsulas, pellets y los polvos mojables. La diferencia entre éstos se basa principalmente en su tamaño, así entonces los polvos están entre los 5 y los 20 μm de diámetro, los gránulos tienen entre 0.1 y 6 mm de diámetro, los pellets tienen un diámetro mayor a 6 mm, las cápsulas tienen un tamaño similar a los gránulos pero se diferencian en que llevan una membrana externa que protege el ingrediente activo y las briquetas son bloques sólidos grandes de hasta varios centímetros cúbicos (Burges, 1998). Este tipo de bioinsumos se emplean esencialmente en el suelo, en inoculación de semillas o también pueden aplicarse en la filósfera cuando se mezclan con agua (Sánchez, 1998). Hoy en día la mayoría de bioinoculantes se presentan en forma de gránulos ya que éstos permiten tener una concentración más alta del ingrediente activo, son fáciles de manipular, transportar y almacenar, y generan pocas nubes de polvo lo que evita afectar a las personas implicadas en el proceso y disminuye la pérdida de materiales (Burges, 1998; Herrmann, 2013; Sánchez, 1998).

Por otra parte las suspensiones concentradas, las emulsiones y las formulaciones encapsuladas hacen parte del grupo de suspensiones líquidas. En este tipo de formulación, el ingrediente activo es transportado mediante un diluyente que generalmente es agua o aceite, y con el fin de tener un mayor control de las gotas al atomizarlo se le adicionan surfactantes y emulsificantes. Las principales ventajas de estos bioinsumos son su fácil manipulación al ser usado, altas concentraciones del ingrediente activo y su acción biológica es rápida (Bashan & Bashan, 2013). Además, estos productos son eficientes al emplearse en pequeños volúmenes porque así se tiene

Capítulo I

mayor seguridad que el ingrediente activo no sea lavado con el constante riego. Es por esto que se recomienda que este tipo de formulado se emplee en pequeñas hectáreas de cultivo (Burges, 1998). Dentro de las desventajas de estas formulaciones se encuentran el alto costo y la dificultad para almacenarlos y transportarlos, debido a que son de volúmenes grandes. Deben guardarse bajo temperaturas de 4°C aproximadamente para conservar su eficiencia más tiempo, son sensibles a cambios de temperatura y es difícil tener control del número de bacterias aplicadas al cultivo (Bashan & Bashan, 2013; Burges, 1998; Herrmann, 2013; Sánchez, 1998).

Actualmente se tienen varios productos comerciales en el mercado con diferentes tipos de formulaciones, entre ellos se pueden mencionar: Aspire®, un polvo humectable cuyo ingrediente activo es el hongo *Candida olephila*, el cual contrarresta las enfermedades causadas por las especies *Botrytis* spp. y *Penicillium* spp. en los cultivos de frutos cítricos; el formulado líquido denominado Blue Circle® que mediante los mecanismos de acción del *Burkholderia cepacia* inhibe los efectos de varios géneros, entre ellos el *Fusarium* en vegetales; AQ10 Biofungicida® formulado como gránulo humectable para atacar el hongo parásito *Oídio* que afecta los cultivos de manzana, pepino, uvas, fresas y tomates, por medio de la acción del *Ampelomyces quisqualis*; System 3®, está en forma de polvo y su ingrediente activo es *Bacillus subtilis* para atacar patógenos de plántulas de algodón, frijol, arroz, maní y soya (Burges, 1998); el biofungicida Sonata®, una suspensión concentrada de la cepa *B. pumilus* QST 2808 empleado para el control de enfermedades como Gota en tomates y Sigatoka negra en bananos; Serenade ASO®, formulado líquido con *B. subtilis* QST 713 como ingrediente activo para el control de la Sigatoka negra; Subtilex® NG, un fungicida biológico cuyo principio activo es la cepa *B. subtilis* MBI 600 usado para el control de *Botrytis* spp., *Fusarium*, *Rhizoctonia* y *Pythium*.

1.2.1 Formulaciones granulares

La granulación se define como una operación unitaria en la cual partículas de pequeño tamaño se aglomeran para formar masas más grandes (Kadam, 1990). Los principales objetivos que se desean obtener con este proceso son mejorar las propiedades de flujo y la apariencia del producto, alcanzar una composición uniforme de los componentes, evitar la segregación, reducir el polvo, densificar el material y mejorar la dispersabilidad y solubilidad del producto en el agua (Burges, 1998; Kadam, 1990).

El proceso de granulación se puede dividir en cuatro categorías principales, las cuales son compactación, agitación, formación de gotas y unión por calor. La más utilizada para llevar a cabo la granulación de productos biológicos es compactación que a su vez se divide en compresión o vía seca, donde los materiales pasan por unos moldes que le dan la forma final mediante el uso de la presión; y extrusión o vía húmeda, donde se obtiene una masa que luego se hace pasar por unos pequeños orificios de un equipo que le dan la forma deseada (Kadam, 1990). La extrusión consta de tres etapas principales las cuales son:

- **Mezclado:** es una operación unitaria que busca uniformidad en las diferentes propiedades del producto a trabajar, tales como color, textura y concentración (Shenoy & Innings, 2015). Para los bioproductos generalmente, este proceso da inicio con la mezcla seca de los sólidos, buscando que las partículas de los mismos estén en contacto unos con otros lo que se ve influenciado por su tamaño, forma y fluidez (Shenoy & Innings, 2015). El tiempo de esta mezcla depende de las condiciones estipuladas de la formulación a desarrollar, pero usualmente este valor está entre los 2 y los 10 minutos (Timko, Cliff, & Rosenberg, 1990). Posteriormente, se adiciona el aglutinante elegido para la formulación sobre los sólidos mezclados (Jin & Grigas, 1998), que aparte de ayudar a formar la masa sirve como lubricante para reducir la fricción en la etapa siguiente del proceso (O'Connor, 1990). Su distribución se da mediante tres estados: pendular, donde se forman puentes de contacto débiles entre los sólidos y el líquido; estado funicular, donde se tiene un mayor contacto entre ambos; y el capilar, que representa el estado en que el líquido ocupa todos los espacios vacíos que habían entre las partículas sólidas (Schwartz, 1990), formando así la masa húmeda que pasará a ser extruida.
- **Extrusión:** Este es el proceso mediante el cual se hace pasar una masa húmeda a través de uno o varios orificios de un determinado equipo para definir su forma. Este puede llevarse a cabo mediante un proceso por lotes, donde el equipo más utilizado es el tamiz o canasta extrusora; o un proceso continuo, con el uso de extrusores de tornillo (Kadam, 1990). La tasa de producción de los extruidos depende del tamaño y la cantidad de orificios que tiene el extrusor elegido, el diseño del tornillo o tamiz y la velocidad rotacional que posee el equipo. Por otra parte, la longitud de los gránulos puede determinarse mediante el tipo de extrusor elegido, la adición de cortadores al

mismo y las propiedades definidas para la formulación a desarrollar (O'Connor, 1990). Finalmente, cuando se ha trabajado toda la masa húmeda, se llevará el producto obtenido a la etapa de esferonización si se quiere obtener pellets, los cuales tienen una forma esférica y un tamaño mayor que los extruidos (mayor a 600 μm), o si por el contrario el tamaño y la forma son los deseados se lleva directamente al proceso de secado (Kadam, 1990).

- **Secado:** Esta etapa se define como la eliminación de cantidades pequeñas de agua u otros líquidos orgánicos de materiales a procesar (Geankoplis, 1998). Las dos técnicas de secado más comunes para los productos biológicos son la liofilización, que consiste en congelar el producto para luego eliminar el líquido como vapor por sublimación; y la aspersion, en la que una suspensión es rociada en una corriente de aire caliente la cual evapora el líquido retenido en las gotas que se forman (Burgess, 1998; Geankoplis, 1998). Sin embargo, debido a que el primer método es muy costoso y el segundo no es factible para el secado de gránulos húmedos, es común el uso del secador de lecho fluidizado para este tipo de formulado (Paau, 1998). En éste se da una fuerza de arrastre de partículas sólidas ejercida por un gas que atraviesa desde abajo el lecho de las mismas haciéndolas flotar. Es recomendable no tener un lecho de sólidos muy profundo y una velocidad de secado muy alta porque esto puede generar burbujas de gas que causan problemas en el proceso. Además, según Kadam (1990), la temperatura adecuada en el secado de lecho fluidizado está entre los 30 y los 80°C aproximadamente, teniendo presente si el microorganismo es o no termolábil (Kadam, 1990).

1.2.2 Antecedentes de formulaciones biológicas granulares

En los últimos años las industrias han estado en una constante búsqueda para desarrollar productos biológicos aplicables a la agricultura, pues el interés por éstos ha ido incrementando considerablemente (Bashan, 1998). Sin embargo, para escalar los productos desarrollados a un nivel de producción comercial es necesario evaluar algunos puntos claves para asegurar su permanencia en el mercado, incluyendo entre éstas la demanda del producto, el tamaño del mercado potencial, los productos existentes de la competencia y el cumplimiento de las diferentes regulaciones estipuladas para su

comercialización, las cuales evolucionan a medida que se desarrollan más productos de este tipo y varían de país en país (Fravel, Connick Jr, & Lewis, 1998).

Algunos de los productos que han logrado cumplir con estas condiciones y que ahora están en el mercado se describen en la siguiente tabla.

Tabla 1. Bioinsumos comerciales más reconocidos, producidos en diferentes países

NOMBRE COMERCIAL	INGREDIENTE ACTIVO	EMPRESA	OBJETIVO	FUNCIÓN	REFERENCIA
SoilGard 12 G®	<i>Trichoderma virens</i>	Certis USA LLC	Controla los patógenos de plantas ornamentales y de cultivo provocados por <i>Rhizoctonia</i> , <i>Pythium</i> y <i>Fusarium</i>	Biofungicida	(Fravel et al., 1998)
Soil Implant®	<i>Bradyrhizobium japonicum</i>	Novozymes, Estados Unidos	Haba de soya	Bioinoculante	(Novozymes, 2011)
Promarine®	<i>Bacillus subtilis</i>	Sino-Aqua company Taiwan	Acuicultura (camarones)	Probiótico	(Cartman & La Ragione, 2004)
RootShield Granules®	<i>Trichoderma harzianum</i>	BioWorks, Estados Unidos	Frutas pequeñas, hortalizas de bulbo, granos de cereal, frutas cítricas, hortalizas de fruto, flores, plantas ornamentales y de lecho, leguminosas y oleaginosas	Biofungicida	(Fravel et al., 1998)
Azogreen®	<i>Azospirillum lipoferum</i>	Francia	Maíz	Bioinoculante	(Bashan, 1998)
DiTera WG®	<i>Myrothecium verrucaria</i>	Valent Biosciences Chile S.A	Uva, tomate, hortalizas y cítricos	Bionematicida	(Bashan, 1998)
Kodiak®	<i>B. subtilis</i>	Bayer CropScience	Algodón, soya, maní, maíz, Semillas, trigo y cebada	Biofungicida	(Emmert & Handelsman, 1999)

1.3 *B. subtilis* como principio activo

B. subtilis es una bacteria aerobia Gram positiva en forma de bacilo perteneciente a la familia *Bacillaceae*, género *Bacillus* y especie *subtilis* (Layton, Maldonado, & Monroy, 2011). Tiene un mecanismo de defensa denominado esporulación, el cual le permite sobrevivir bajo condiciones desfavorables en el ambiente. Este proceso, cuya duración es de 6 a 8 horas, consta de 7 estadios, iniciando con la falta de nutrientes para la célula lo que hace que ésta deje de crecer y finalizando con la producción del esporangio, compartimento que encierra un segundo compartimento creado denominado, espora (Juárez, 2004).

B. subtilis puede encontrarse en las raíces de las plantas, el suelo y en el tracto gastrointestinal de los animales (Layton et al., 2011). Ésta es una gran productora de metabolitos secundarios como los antibióticos, entre los que se puede mencionar la surfactina e Iturina A, por medio de los cuales inhibe el crecimiento de microorganismos patógenos para las plantas como algunos hongos (Layton et al., 2011; Urdaci & Pinchuk, 2004). Adicionalmente secreta auxinas, citoquininas y giberelinas, fitohormonas que modifican la homeostasis de las plantas, lo que estimula su crecimiento (Beauregard, Chai, & Vlamakis, 2013; Cartman & La Ragione, 2004).

Desde años atrás se han utilizado en diferentes áreas productos comerciales cuyo principio activo es la especie *B. subtilis* como: el biofungicida Kodiak® usado para proteger los cultivos de los agentes patógenos *Fusarium*, *Rhizoctonia* y *Apergillus* (Emmert & Handelsman, 1999), mediante la producción de antibióticos como la Iturina A que ayuda a inhibir el crecimiento de estos patógenos en las plantas (Bayer, 2007); probióticos que contribuyen al equilibrio microbiano intestinal como el Biosubtyl®, Bactisubtil® y Enterum® en seres humanos y el BioGrow® y Bioplus® en animales, en los que el *Bacillus* compite por el sustrato que las bacterias patógenas necesitan para crecer y modifica el pH de esta zona (Cartman & La Ragione, 2004; Senesi, 2004); y detergentes fabricados con proteasas, enzima producida por varias cepas de *Bacillus* entre esas la especie *subtilis*, la cual reduce la tensión superficial del agua mejorando así las condiciones de lavado (Tabandeh & Yakhchali, 2008).

Actualmente, esta bacteria es la base de diferentes estudios e investigaciones para el desarrollo o mejora de productos comerciales debido a su capacidad para promover el crecimiento vegetal mediante la producción de sustancias que permiten una mejor

absorción de nutrientes por parte de las plantas e inhiben la aparición de microorganismos patógenos en éstas, además del interés por su esporulación lo que permite su supervivencia en ambientes adversos y por un tiempo más prolongado que otras (Araujo, 2008a). Entre las investigaciones que se han realizado se puede mencionar la de Niu y colaboradores (2015) donde muestra que la cepa comercial de *B. subtilis* GB03 mejora el crecimiento de la raíz de la planta herbácea *Puccinellia tenuiflora* en un 97% y en un 15 % aumenta el contenido de clorofila en sus hojas (Niu, Paré, & Aziz, 2015). Araujo y colaboradores (2005) por otra parte, encontraron que la producción de auxinas por parte de *B. subtilis* provee beneficios en el crecimiento de la soya (Araujo, 2008b). En un artículo publicado por Podile y Lami en 1998 mostraron que al inocular las semillas de la leguminosa guandú con la cepa *B. subtilis* AF1 se genera un aumento de la enzima fenilalanina liasa de amonio (PAL) la cual actúa como una defensa ante presencia de patógenos (Kilian, Steiner, & Krebs, 2000).

La cepa *B. subtilis* B-908 es empleada en los cultivos de arroz para reducir en un 60% la enfermedad denominada tizón de la vaina e incrementar entre un 7.7% y un 26.5% su rendimiento (Tang, Mei, & Zhang, 1996). Finalmente, podrían citarse la investigación a nivel de laboratorio hecha por Kilian y colaboradores (2000) al aplicar el producto FZB24® en el vegetal colinabo, dando como resultado un incremento del 5% en el peso seco de sus raíces y un crecimiento de las plantas al final del cultivo 12% más altas.

Aunque en el mercado actual existen productos con base en *B. subtilis* creados para mejorar la productividad de determinados cultivos, en la investigación que se desarrolla en este trabajo no se han encontrado aquellos que cumplan las mismas condiciones que se han especificado para el producto que en este trabajo se desarrolla, las cuales son: formulado granular tipo pesta con base en esta misma bacteria que estimule el crecimiento vegetal. Sin embargo, se han hallado investigaciones tales como la de Connick y colaboradores (1997) donde se analiza la formulación granular tipo pesta preparada con 7.4 g de caolín, 32 g de semolina, 0.6 g de mezcla de tierra de diatomea y 23 mL de agua desionizada, formulación que difiere en el tipo de componentes que constituyen el producto descrito en este trabajo, concluyendo que ésta permite conservar la viabilidad del microorganismo trabajado en un 95% después de 52 semanas de almacenamiento bajo una temperatura de 25°C. Así mismo, en otros estudios se demostró que este tipo de formulación mejora la eficiencia de los productos y conserva la

Capítulo I

viabilidad del microorganismo durante el proceso de granulación y al almacenar éstos a una temperatura de 4°C (Connick, Nikle, & Vinyard, 1993; Shabana, D, & Sauerborn, 2003; Yang, Wang, & Yang, 2015; Zahran, Sauerbon, & Abbasher, 2008).

1.3.1 *B. subtilis* EA-CB0575

Esta cepa fue aislada de la rizósfera del cultivo de banano en el Urabá Antioqueño, Colombia en 2009, y se conservó en el medio de cultivo TSB con 20% de glicerol a -80°C (Ramírez, 2012). En el 2010 se especificó que ésta es una rizobacteria que promueve el crecimiento en plantas de tomate, pimentón, cilantro y maíz (Posada, 2012), además de ser antagonista de *Fusarium* sp., *Ralstonia solanacearum*, *Botrytis cinérea*, *Rhizoctonia solani* y *Mycopharella fijiensis* a nivel *in vitro*. Se han realizado además evaluaciones de promoción de crecimiento a nivel de invernadero y campo con resultados exitosos. Estos datos no han sido publicados.

Para el año 2012 con el fin de incrementar la producción de la bacteria en biomasa y esporulación, Posada diseñó, desarrolló y optimizó el medio de cultivo SBM (Por sus siglas en inglés de “Sporulation *Bacillus* Medium”). Adicionalmente, evaluaron los parámetros necesarios para llevar a cabo la fermentación en un biorreactor de 14 L, 80 L y 800 L; se evaluó la eficiencia de esta bacteria en las plantas de banano a nivel invernadero donde se determinó que el porcentaje de crecimiento de éstas era del 16 y 49%, especificando también que para lograr un mejor resultado se debe manejar una dosis entre 10^{-7} y 10^{-8} UFC/mL; y realizó un diseño conceptual del proceso de producción de *B. subtilis* EA-CB0575 a nivel planta piloto (Posada, 2012).

Más adelante, se evaluó la promoción de crecimiento de esta cepa en cultivos de banano, crisantemo y café haciendo la inoculación como polvo mojable. En el caso del banano, con una concentración de $1 * 10^8$ UFC/mL de la bacteria se logró un aumento del 31.6% de la longitud aérea, 17.5% del diámetro de la planta, 19.8% del número de hojas, 85% del peso seco aéreo y 59.8% del peso seco total; en el café se presentó un efecto negativo en su crecimiento; y en las flores de crisantemo, hubo un aumento del peso fresco radicular del 27% al 51% en esquejes hormonados (Cuéllar, 2014). Gutiérrez en el 2014, modificó el formulado tipo pesta empleado en los ensayos realizados por Cuéllar en ese mismo año, cambiando su formulación de polvo mojable a gránulos dispersables en agua (WG, Wetable granules por sus siglas en inglés), con lo que se

logró mantener la concentración del microorganismo durante el tiempo de evaluación (4 meses), disminuyó la presencia de contaminación, presentó una mayor estabilidad y se evidenció homogeneidad de la bacteria en todo el formulado (Gutiérrez, 2014). Actualmente se está trabajando en el proceso productivo de este producto, es por esto que con la presente investigación se buscó optimizar las condiciones de operación de los equipos empleados en la etapa de mezclado y secado; y con el fin de verificar que el producto obtenido cumpla con las normas establecidas por el ICA (Instituto Colombiano Agropecuario) respecto a sus propiedades fisicoquímicas (humectabilidad, suspensibilidad, pH).

1.4 Normas Técnicas Colombianas para insumos biológicos aplicados a la agricultura

Para el control de la producción y comercialización de los insumos biológicos, el Instituto Colombiano de Normas Técnicas y Certificación (ICONTEC) ha expedido una serie de requisitos que complementan la regulación establecida por el Instituto Colombiano Agropecuario (ICA) para el registro de productores y ventas para este mercado en el país (Bioinsumos, 2012). En el siguiente cuadro se detallan las normas requeridas para el desarrollo del producto de interés en este trabajo.

Capítulo I

Tabla 2. Normas Técnicas Colombianas (NTC) y sus especificaciones

NORMA	FECHA Y LUGAR DE RATIFICACIÓN	OBJETIVO	REQUISITOS	REFERENCIA
<p>NTC 4422-1: Bioinsumos para uso agrícola.</p> <p>Agentes biológicos para el control de plagas y enfermedades.</p> <p>Parte 1: Producción</p>	<p>Noviembre 21 de 2012</p> <p>Bogotá D.C</p> <p>(Actualización)</p>	<p>Requisitos de producción, almacenamiento y empaque</p>	<p>-Tener equipos e instalaciones adecuadas para cada una de las actividades de producción.</p> <p>-Adyuvantes: nivel farmacéutico, alimenticio o cosmético</p> <p>-Cepas: identificadas y debidamente conservadas</p> <p>-Contar con instructivos documentados que expliquen la forma de operar en cada etapa del proceso.</p>	<p>(Bioinsumos, 2012)</p>
<p>NTC 5842: Bioinsumos para uso agrícola</p> <p>Inoculantes biológicos</p>	<p>Abril 13 de 2011</p> <p>Bogotá D.C</p>	<p>Requisitos para inoculantes biológicos y técnicas para su control de calidad</p>	<p>-Concentración mínima (UFC/mL o UFC/g): 1×10^7</p> <p>-Pureza: 95% de lo estipulado por el fabricante</p> <p>-No deben ser patógenos para animales, humanos y plantas</p> <p>-Actividad biológica: estadísticamente significativa ($\alpha:0,05$)</p> <p>-El productor especifica los valores de humedad, pH y densidad.</p>	<p>(Bioinsumos, 2011)</p>
<p>NTC 439: Plaguicidas, coadyuvantes y reguladores fisiológicos.</p> <p>Ensayos de suspensibilidad, humectabilidad y criterios de aceptación</p>	<p>Julio 22 de 2015</p> <p>Bogotá D.C</p>	<p>Describe los procedimientos técnicos que se deben hacer al producto</p>	<p>-Hmectabilidad: Tiempo que tarda la muestra de producto en mojarse totalmente. Criterio de aceptación: ≤ 1 min</p> <p>-Suspensibilidad: Porcentaje del principio activo del producto que queda en suspensión después de un tiempo determinado. Criterio de aceptación: Entre 60% y 105%</p>	<p>(Plaguicidas, 2015)</p>

NTC 5527: Fertilizantes. Análisis físicos	Septiembre 26	Especifique las	-pH	(Fertilizantes, 2007)
	de 2007	técnicas que se le	-Solubilidad	
	Bogotá D.C	deben realizar a los	-Densidad	
		fertilizantes		

*Continuación de la tabla 2

Estas normas hacen parte de una serie de requisitos exigidos por la entidad regulatoria en Colombia (ICA) para la producción y comercialización de productos biológicos (ICA, 2011), las cuales se basan en las normas instauradas por las entidades internacionales encargadas de velar por una agricultura sostenible a nivel mundial, estas son: Collaborative International Pesticides Analytical Council Limited (CIPAC) ubicado en el Reino Unido y la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO) (Plaguicidas, 2015). Aunque las regulaciones para el registro de este tipo de productos varían de país en país, en todos aquellos donde dichas entidades internacionales actúan basan sus reglamentos en las exigencias internacionales, como es el caso de Nicaragua y Costa Rica.

Capítulo II:

Optimización de las etapas de mezclado y secado del proceso productivo de un bioinoculante con base en *Bacillus subtilis* EA-CB0575

Resumen

Las etapas más comunes que hacen parte de un proceso productivo para la fabricación de inoculantes biológicos son mezclado, ampliación de tamaño y secado, los cuales se adecúan según el tipo de formulación que se quiere para el producto. En el presente trabajo se optimizaron las condiciones de operación de la mezcladora Actum modelo AML 1000 y el secador Sherwood Scientific empleados en la producción de un inoculante biológico con base en *B. subtilis* EA-CB0575, mediante el uso de diseños estadísticos de superficie de respuesta (CCD y Box and Behnhen). Para la etapa de mezclado se empleó un CCD evaluando los factores tiempo de mezclado (10 y 40 min), y velocidad de mezclado (40 y 150 rpm). Según el proceso de optimización empleado, los niveles que deben emplearse para optimizar el proceso de mezclado son 133 rpm y 46 minutos. Esto se validó en dos réplicas en tiempos diferentes con un error promedio de 11%. Para la optimización de la etapa de secado se empleó un diseño de Box – Behnken cuyos factores de evaluación fueron ajuste de la velocidad de secado en el equipo (2.03, 2.75, 3.65 m/s), temperatura de secado (30-55 y 80 °C) y tiempo de secado (10-25-40 minutos), determinándose que a 46.2 °C, un ajuste de velocidad de 4, equivalente a 2.03 m/s y en 33 minutos se logra un óptimo para el secado en el área de trabajo evaluada, de acuerdo a las variables de respuesta viabilidad promedio (Log UFC/g), desviación de la viabilidad (Log UFC/g) y la humedad del producto (% g/g). Esta última optimización

también fue validada encontrándose un error de 4.35%. Con estas condiciones estandarizadas se cumplen los requisitos del proceso especificados en la Norma Técnica Colombiana 4422-1, que fue aprobada en 1998.

Palabras claves: Optimización de parámetros de operación, *Bacillus subtilis* EA-CB0575, mezclado, secado, bioinoculante.

2.1 Introducción

Un inoculante biológico es un insumo agrícola con base en microorganismos viables benéficos (ICA, 2011) cuyo objetivo es fomentar el crecimiento, favorecer la absorción de nutrientes y controlar enfermedades de las plantas (Baquero & Tobar, 2007). Dentro de este grupo se clasifican los microorganismos promotores de crecimiento vegetal donde se distinguen las PGPR, aquellas bacterias que actúan en la zona del suelo adyacente a la raíz, denominada rizósfera (Vessey, 2003). Dentro del género *Bacillus* la especie *subtilis*, bacteria aerobia Gram positiva estudiada para el desarrollo de estos productos, ha sido de gran interés debido a su producción de metabolitos como antibióticos, fitohormonas y enzimas, que por medio de mecanismos como la inhibición de patógenos y el cambio de la homeostasis en las plantas promueven el crecimiento de éstas (Beauregard et al., 2013; Cartman & La Ragione, 2004; Layton et al., 2011).

Para el proceso de producción de un bioinoculante es necesario en primera instancia desarrollar la formulación correcta, ya sea líquida o sólida (Bashan & Bashan, 2013; Burges, 1998), eligiendo el diluyente y los adyuvantes adecuados según el tipo de microorganismo que se desea conservar y proteger (Herrmann, 2013). Seguido a esto, se debe definir el mezclado, el proceso de ampliación de tamaño y el secado (Burges, 1998), teniendo claro que en el mezclado se busca que todos los ingredientes involucrados tanto líquidos como sólidos se combinen totalmente (Shenoy & Innings, 2015); con la ampliación de tamaño se pretende dar forma al producto (Kadam, 1990); y con la etapa de secado se quiere eliminar pequeñas cantidades de líquido contenido en los materiales a procesar (Geankoplis, 1998). Sin embargo, para lograr un producto con las características deseadas es necesario que los equipos empleados durante el proceso operen bajo condiciones óptimas, pues esto permite que se reduzcan los tiempos de producción y reprocesos, evita el gasto excesivo de energía y ayuda a la estandarización

Capítulo II

del proceso lo que se refleja directamente en la calidad del producto (Kadam, 1990). Para ello se emplea la optimización basada en métodos estadísticos, cuyo objetivo es encontrar los valores de las variables que maximicen, minimicen o lleven a un valor objetivo las variables de respuestas (Edgar & Himmelblau, 1988). Uno de los diseños estadísticos que permiten optimizar procesos es la metodología de superficie de respuesta (SRM, del inglés Surface Response Methodology) la cual se define como: “estrategia experimental y de análisis que permiten encontrar los valores óptimos de una o varias características de calidad de un producto” (Gutiérrez & De la vara, 2008).

En este estudio se emplearon dos diseños de superficie de respuesta para definir las condiciones de operación óptimas de los equipos usados en la etapa de mezclado y secado en la producción, a nivel de planta piloto, de un inoculante biológico con base en *B. subtilis* EA-CB0575.

2.2 Materiales y métodos

2.2.1 Producción de la suspensión bacteriana

La cepa *B. subtilis* EA-CB0575, aislada de la rizósfera de una planta de banano en el Urabá Antioqueño y conservada a -80°C en medio TSB con 20% de glicerol (Ramírez, 2012), fue inoculada en medio SBM modificado (“Sporulation *Bacillus* Medium”) (Posada, 2012; Posada et al., 2015) y su proceso de producción se realizó en un biorreactor de 14 litros de volumen total marca New Brunswick Scientific Co. para su producción, los parámetros de trabajo en el equipo se determinaron previamente en el estudio de Posada y colaboradores en el 2015 (Cuéllar, 2014; Posada, 2012). El proceso duró tres días y se alcanzó una producción de $1 * 10^{10}$ UFC/mL del microorganismo en forma de esporas. Posteriormente, a la biomasa producida se le hizo un choque térmico en baño María a 80°C por 20 minutos para obtener sólo las esporas; luego de enfriar el producto a temperatura ambiente, se centrifugó 30 minutos a 4500 rpm y 4°C (centrífuga Hettich), en tubos de 50 mL. El sobrenadante obtenido se desechó mientras que el pellet (bacterias en forma de esporas) se resuspendió en 5 mL de agua destilada estéril, valor correspondiente al 10% del volumen de fermentado de cada tubo (50 mL). Se prepararon 3600 mL de suspensión que se mezcló con los adyuvantes ITr10 X-100, IT09 20, IG08, ISp11 y IBf12 3M para ser usado como porción líquida en las corridas experimentales y

posteriormente determinar las condiciones óptimas de la mezcladora y el secador (Gutiérrez, 2014).

2.2.2 Preparación del material sólido

Se pesaron los adyuvantes sHt01, sCa02, sBt03, sCN04, sC05 y sGX06, componentes de la porción sólida de un bioformulado tipo Pesta WG (Shabana et al., 2003; Yang et al., 2015; Zahran et al., 2008), se almacenó cada uno de estos en recipientes y luego, se esterilizaron en la autoclave horizontal Eastein modelo EA 620 a 121°C por 15 minutos bajo una presión de 15 psig. Se prepararon 30 bolsas de cada uno de los sólidos para llevar a cabo las corridas experimentales definidas para optimizar las condiciones de operación en la etapa de mezclado y secado, y se procedió al proceso de mezclado.

2.2.3 Proceso de mezclado

Para iniciar el proceso de mezclado, se hizo la limpieza y desinfección de la mezcladora y su respectivo ensamble como se indica en el protocolo de mezcla de sólidos (Anexo A). Para determinar las condiciones de operación óptimas se realizó un diseño de superficie de respuesta CCD (Central Composite Design) con 11 corridas experimentales, evaluándose con ellas los factores de tiempo de mezclado y velocidad de mezclado, cuyos niveles fueron 10 y 40 min y 40 y 150 rpm, respectivamente. Las variables de respuesta estudiadas fueron la viabilidad promedio del ingrediente activo (Log UFC/g) y su desviación estándar (evaluada entre las muestras tomadas en cada corrida experimental, Log UFC/g).

Para cada una de las corridas se procesaron 380 g de bioformulado bajo las condiciones determinadas en el diseño de experimentos (Tabla 3). De la masa obtenida en cada tratamiento se tomaron tres muestras de diferentes puntos, se hicieron diluciones seriadas de éstas y luego se sembraron por superficie 100 microlitros de las dos últimas diluciones (10^{-6} y 10^{-7}) en cajas con TSA al 50%, las cuales se incubaron por 24 horas con una temperatura de 30°C. Los resultados obtenidos de las variables de respuesta se llevaron a Log (UFC/g) y fueron analizados mediante la tabla ANOVA con un nivel de confianza del 95%, además de hacer la optimización para cada una de las variables y una optimización multivariable construyéndose la curva y contornos de superficie de

Capítulo II

respuesta adaptados a la maximización de la viabilidad promedio y minimización de la desviación estándar.

Tabla 3. Diseño CCD para la optimización de las condiciones de operación de la mezcladora Actum

N° de corrida	Velocidad de mezclado (rpm)	Tiempo de mezclado (min)
1	95	46.2132
2	150	10
3	95	3.7868
4	150	40
5	95	25
6	95	25
7	40	40
8	40	10
9	172.782	25
10	17.2183	25
11	95	25

2.2.4 Proceso de secado

Para encontrar las condiciones de operación óptimas del secador de lecho fluidizado Sherwood Scientific se hizo un diseño de superficie de respuesta Box – Behnken de tres factores (temperatura de secado, ajuste de la velocidad de secado, tiempo de secado) y tres niveles para cada uno (temperatura: 30-55-80 °C; velocidad: 2.03, 2.75, 3.65 m/s; tiempo: 25-10-40 min). Se trabajaron 15 corridas experimentales para cada una de las cuales se procesaron 380 g de bioformulado (ver tabla 4) empezando con la mezcla de la porción sólida y luego la líquida, con las condiciones de operación optimizadas para ese equipo de acuerdo a los resultados obtenidos en el numeral 2.3.1, seguido del proceso de granulación de la masa obtenida (Anexo B) y finalmente según las condiciones

establecidas en el diseño experimental los gránulos se secaron en el equipo enunciado (Anexo C).

Las variables de respuesta analizadas fueron la viabilidad promedio del ingrediente activo (Log UFC/g), la desviación estándar de ésta (evaluada entre las muestras tomadas en cada corrida, Log UFC/g) y el porcentaje de humedad del producto terminado (% g/g, medido según la norma NTC 282 de 1986). Para evaluar las dos primeras se tomaron dos muestras del bioformulado terminado en cada una de las corridas con las que se hicieron diluciones seriadas y las dos últimas diluciones (10^{-6} y 10^{-7}) se sembraron por superficie en cajas con TSA al 50%. Mientras que para el porcentaje de la humedad se pesaron 5 g de bioinoculante de cada corrida y se pusieron en una estufa por 24 horas a 100°C, después de cumplido el tiempo se pesaban las muestras y se repetía el mismo proceso cada 30 min hasta que los dos últimos pesos no tuvieran una diferencia mayor a 0.001g entre sí (ICONTEC, 1986). Los resultados obtenidos se analizaron mediante una tabla ANOVA con un nivel de confianza de 95%, y se hicieron las curvas y contornos de superficie de respuesta para la optimización de cada una de las variables y la optimización multivariable adaptada a la maximización de la viabilidad y minimización de la desviación y el porcentaje de humedad.

Tabla 4. Diseño Box-Behnken para optimizar las condiciones de operación del secador Sherwood Scientific

N° corrida	Temperatura (°C)	Velocidad (rpm)	Tiempo (min)
1	55	7	25
2	80	4	25
3	80	7	10
4	55	4	40
5	55	10	10
6	30	7	10
7	55	10	40
8	30	4	25
9	30	7	40
10	80	7	40

11	30	10	25
12	55	4	10
13	55	7	25
14	55	7	25
15	80	10	25

*Continuación tabla 4

2.2.5 Validación de la optimización de los equipos

Después de tener las condiciones de operación óptimas tanto de la mezcladora como del secador, se realizaron dos corridas con las condiciones que arrojó la optimización con el fin de validar los resultados obtenidos de las ecuaciones matemáticas para las optimizaciones de los equipos. Los procedimientos y análisis estadísticos llevados a cabo fueron los mismos que se describieron en el numeral 2.2.3 y 2.2.4, adicionando a esto un estudio del porcentaje de error cuyo resultado debía ser menor al 10% para ser aceptados los resultados de ambos equipos.

2.2.6 Diseño de experimentos y análisis estadístico

Tanto para el diseño CCD como para el diseño Box-Behnken se hizo un análisis mediante el Software Statgraphics centurion XV.I. Para ambos casos se hizo un estudio del análisis de varianza (ANOVA), diagrama de Pareto y gráficos de optimización para cada una de las variables mediante el modelo polinomial de segundo orden (ec 1).

$$y(x_i) = b_0 + \sum_{i=1}^n b_i x_i + \sum_{i=1}^n b_{ii} x_i^2 + \sum_{i=1}^n \sum_{j=1}^n b_{ij} x_i x_j + \varepsilon \quad (1)$$

Donde $y(x_i)$ representa la variable de respuesta, b_0 es el coeficiente de intersección, b_i el coeficiente del efecto lineal, b_{ii} es el coeficiente para el efecto cuadrático, b_{ij} coeficiente del efecto de interacción, x_i es la variable independiente y ε es el error aleatorio.

Después de esto y maximizando la viabilidad promedio (variable de respuesta), se hizo un análisis multivariable (analizando todas las variables de respuesta al mismo tiempo) mediante el gráfico de superficie de respuesta, gráfico de contornos y valores óptimos calculados por medio de las ecuaciones de optimización 2 y 3.

La ecuación 2 representa la función de deseabilidad calculada para las respuestas de cada una de las variables determinadas a través de la ecuación 1. En ésta $y(x_i)$ representa las respuestas obtenidas de la ecuación 1, s es el peso de la variable $y(x_i)$ en la optimización múltiple, L_i es el valor más alto logrado de la respuesta i y U_i es el valor más bajo de esta misma respuesta.

$$d_{i(y(x_i))} = \left\{ \begin{array}{ll} 0, & \text{if } y(x_i) < L_i \\ \left(\frac{y(x_i) - L_i}{U_i - L_i} \right)^s, & \text{if } L_i \leq y(x_i) \leq U_i \\ 1, & \text{if } y(x_i) \geq U_i \end{array} \right\} \quad (2)$$

La ecuación 3 indica la deseabilidad global, es decir, las funciones parciales de deseabilidad ($d_1^{r_1}$, $d_2^{r_2}$, $d_n^{r_n}$) se combinan para obtener una función de deseabilidad total (D), donde n es el número de variables y r_i es la importancia relativa designada a cada respuesta.

$$D = (d_1^{r_1} * d_2^{r_2} * \dots * d_n^{r_n})^{\frac{1}{\sum_{i=1}^n r_i}} = \left(\prod_{i=1}^n d_i^{r_i} \right)^{\frac{1}{\sum_{i=1}^n r_i}} \quad (3)$$

2.3 Resultados

2.3.1 Optimización de las condiciones de operación de la mezcladora Actum modelo AML 1000

Según las condiciones de operación permitidas para el uso de la mezcladora se definieron los niveles correspondientes de cada factor para el desarrollo del diseño de superficie de respuesta CCD con estrella que permitieran determinar los valores óptimos de dichas condiciones de operación, lo cual se presenta en la tabla 5. Para estas corridas se obtuvieron los siguientes resultados:

Tabla 5. Resultados de la optimización de la mezcladora Actum

FACTORES			VARIABLES DE RESPUESTA	
Tratamiento	Velocidad (rpm)	Tiempo (min)	Viabilidad promedio Log(UFC/g)	Desviación estándar
1	95.1	46.21	9.6321	0.1870
2	150	10	9.6069	0.1692
3	95.1	3.79	9.5812	0.1537
4	150	40	9.6636	0.1061
5	95.1	25	9.5153	0.1103
6	95.1	25	9.5310	0.1448
7	40	40	9.1038	0.0688
8	40	10	9.3795	0.0535
9	172.8	25	9.4338	0.1242
10	17.22	25	8.8070	0.4289
11	95.1	25	9.8473	0.5673
Valor óptimo	133	46.2	9.731	0.28
Modelo	$8.8515+0.0162*v-0.0122*t-0.00008*v^2+0.0001*v*t+0.00003*t^2$			$0.0413+0.0018*v+0.021*t-0.000009*v^2-0.000023*v*t-0.0004*t^2$
R²	88.7			19.7
Valor-p Velocidad (rpm)	0.0075			0.7366
Valor-p Tiempo (min)	0.7191			0.9993
Falta de ajuste	0.8771			0.779

En los resultados obtenidos, se observa una similitud en los valores de las variables de respuesta de los puntos al centro (95.1 rpm y 25 min), indicando una coherencia y por tanto confiabilidad en éstos. Lo que también puede corroborarse según el valor de falta de ajuste mostrado en la tabla 5, el cual es superior a 0.05 para ambas variables de respuesta señalando así que los modelos desarrollados para la optimización de los equipos se adecúan al diseño de experimentos llevado a cabo (CCD). Adicionalmente, se evidencia que a 17.22 rpm (velocidad de mezclado más baja del diseño) se obtuvo el

menor valor de viabilidad (8.8070 Log (UFC/g)), por lo cual se puede decir que dicha velocidad no es la adecuada para la cantidad de masa procesada pues no se logra la distribución de los componentes (Sarkar & Wassgren, 2009), siendo también el tiempo de mezclado un factor importante pues para alcanzar dicha distribución se requiere un tiempo superior al evaluado en esa corrida (25 min), algo que desvía los objetivos de una optimización pues aumentaría el consumo de energía del equipo y el tiempo de operación (Cazacliu & Legrand, 2008).

Analizando la tabla ANOVA y el diagrama de Pareto (Anexo D) se observa que el factor que presenta una mayor influencia en las variables de respuesta, especialmente la viabilidad promedio, es la velocidad de mezclado pues ésta fue la que logró un valor-p menor a 0.05 y sobrepasó la línea de significancia al igual que la interacción entre este mismo factor. De ahí la variación de los valores de la viabilidad respecto a los de la velocidad de mezclado, porque a pesar que el tiempo es importante, éste no muestra un efecto notorio en estos resultados, por ejemplo las corridas 5, 9 y 10 tienen diferentes valores de velocidad y el mismo tiempo de mezclado, pero los resultados de la viabilidad varían considerablemente.

Además de la tabla ANOVA, se hizo la optimización de cada una de las variables obteniendo sus respectivas gráficas de superficies y valores óptimos, y después de esto se realizó la optimización multivariable (Anexo D). A partir de estos resultados, se tomó la decisión de determinar los valores óptimos buscados para este equipo basándose únicamente en la optimización de la viabilidad promedio, ya que el valor de la R^2 de la desviación estándar es muy bajo y sus valores hallados con el diseño son los mismos que los valores altos de cada factor, por lo que se puede decir que en la región experimental no se tiene un candidato a óptimo. Así entonces, se analizó la gráfica de superficie de respuesta de la viabilidad promedio, mostrada a continuación.

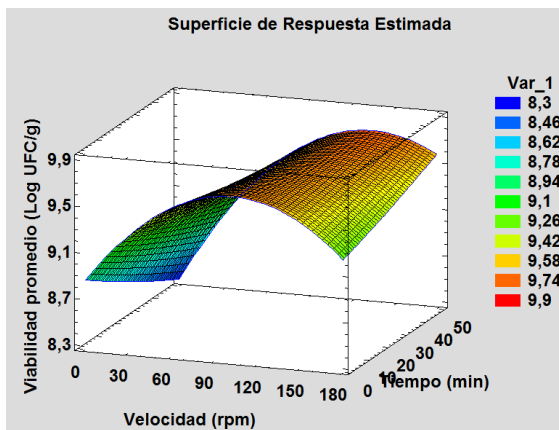


Ilustración 1. Superficie de respuesta para la optimización de la viabilidad promedio

*Se empleó un 95% de confianza

Según la gráfica de superficie de respuesta, en la región comprendida entre 9.58 y 9.9 (Log(UFC/g) de viabilidad promedio), se encuentran los candidatos a óptimos de los factores establecidos. Así entonces, el valor máximo de la viabilidad promedio se alcanza en los niveles 133.6 rpm para la velocidad de mezclado y 46.2 min. para el tiempo de mezclado. Además de lograr una viabilidad aceptable del producto bajo estas condiciones, también se obtiene una masa apropiada para ser extruida con facilidad, porque ésta no debe estar altamente blanda pues así al pasarla por el extrusor, no se logran obtener gránulos separados que al ser secados tengan fluidez, lo cual dificulta el manejo, el racionamiento y afecta la presentación del producto para el agricultor; y tampoco debe quedar con baja humedad porque así aumenta la fricción en el momento de ser extruida haciendo que el proceso sea más arduo y por tanto requiera de mayor tiempo (Kadam, 1990).

Aunque no se han encontrado artículos donde se optimicen las condiciones de operación de un equipo con el tipo de producto trabajado en este estudio, se han hallado investigaciones como la realizada por Bukovec y colaboradores (2009), donde se realiza la optimización de una mezcladora de alta cizalla usada para un proceso de pelletización mediante un diseño Box-Behnken, encontrando que el rendimiento útil del proceso se da a 1300 rpm por un tiempo de 6 minutos. Por otra parte, en búsqueda de hacer más eficiente el proceso de pastelería, Wilson A. J y colaboradores en el 2001 buscaron minimizar el tiempo de mezclado mediante la optimización de una mezcladora con 125 g de capacidad, allí encontraron que para una harina suave se debe tener una velocidad de mezclado de 150 rpm y un tiempo de mezclado de 2 minutos y 25 segundos. En otros

estudios cuyo objetivo principal es mejorar el rendimiento de la operación de mezclado se han encontrado valores de velocidad y tiempo de mezclado tales como: 180 rpm y 4 minutos (Zounis & Quail, 1997); para un granulador de alto cizalle se determinaron los rangos de operación de 80 – 135 rpm y 2 – 6 minutos para no afectar de forma negativa las propiedades fisicoquímicas de los gránulos (Hegedús & Pintye-Hódi, 2007); 300 rpm con 120 segundos de proceso para una mezcladora con 50 g de muestra a nivel laboratorio (Alava & Millar, 2001). Los rangos de velocidad reportadas para las mezcladoras de alta cizalla son entre 60 - 800 rpm, lo que depende de la escala de operación y la velocidad del impeler del equipo específicamente (Rahmanian, Gahdiri, & Ding, 2008), y entre 50-500 rpm, velocidades que por lo general están muy por encima de las definidas para las mezcladoras planetarias típicas (Kadam, 1990).

Los factores claves que se deben tener presente en el momento de optimizar un proceso de mezclado son la capacidad y condiciones del equipo, el tiempo de mezclado y velocidad de mezclado. En el caso de la capacidad, según los resultados reportados por Sarkar y colaboradores (2009), al trabajar con un volumen de producto muy bajo o por el contrario tener uno muy alto, se presenta una mala distribución de los componentes, en el primer caso por que el volumen queda en el fondo del equipo sin poder ser mezclado y en el segundo por el poco espacio para mezclar. Por otra parte, cuando el tiempo de mezclado es muy alto el rendimiento útil del equipo y las condiciones adecuadas de la masa disminuyen, mientras que con tiempos muy cortos el aglutinante no alcanza a fusionarse bien con los sólidos, quedando así una masa muy blanda debido a su alta humedad (Bukovec & Turk, 2009). Finalmente, cuando se tiene una velocidad de mezclado muy alta las fuerzas producen la densificación y el re-estructuras internas de los componentes lo que genera una formación excesiva de grumos, y si la velocidad es muy baja el tiempo de mezclado aumenta en gran medida para lograr el producto deseado (Bukovec & Turk, 2009; A. J. Wilson & Morgenstern, 2001).

2.3.2 Optimización de las condiciones de operación del secador de lecho fluidizado Sherwood Scientific

Con el fin de optimizar el proceso de secado del bioinoculante producido se realizaron las corridas del diseño de Box–Behnken, cuyos niveles se determinaron según las

Capítulo II

condiciones de operación permitidas para el uso del equipo. Estos datos se presentan en la tabla 6. Para estas corridas se obtuvieron los siguientes resultados.

Tabla 6. Resultados de la optimización del secador Sherwood Scientific

Tratamiento	FACTORES			VARIABLES DE RESPUESTA		
	Temperatura (°C)	Ajuste de Velocidad	Tiempo (min)	Viabilidad promedio Log(UFC/g)	Desviación viabilidad	Humedad (%)
1	55	7	25	8.9695	0.2719	20.76
2	80	4	25	8.8605	0.0454	28.00
3	80	7	10	8.8079	0.2296	26.80
4	55	4	40	9.1487	0.0497	26.60
5	55	10	10	8.6772	0.1268	16.20
6	30	7	10	8.8645	0.1329	24.20
7	55	10	40	8.6158	0.2816	10.00
8	30	4	25	8.7037	0.1397	28.20
9	30	7	40	8.3785	0.9182	9.40
10	80	7	40	9.0195	0.2531	10.00
11	30	10	25	8.5815	0.0916	13.00
12	55	4	10	8.4472	0.2084	31.60
13	55	7	25	8.4777	0.0614	22.20
14	55	7	25	8.7371	0.0421	15.20
15	80	10	25	8.7491	0.0983	11.00
Valores óptimos				8.8845	0.0832	13.5608
Deseabilidad				0.77		
Modelos				$9.1287+0.0080^* T-$ $0.0221^* v-$ $0.0284^* t-$ $0.0001^* T^2+0.0007^*$ $T * v+0.0005^* T * t$	$0.1083-$ $0.0024^* T+0.0247^* v$ $- 0.0067^* t +$ $0.00009^* T^2-$ $0.0008^* T * v+0.000$ $02^* T * t-0.0002^* v^2$ $+0.0008^* v * t+0.00$ $002^* t^2$	$19.7409+0.1508^* T$ $+7.623^* v- 2.0500^* t$ $+ 0.00009^* T^2-$ $0.05^* T * v+0.0123^*$ $T * t-0.4604^* v^2$ $+0.0389^* v * t+0.0174$ $* t^2$
R²				73.06	42.6	47.9

Valor-p temperatura (°C)	0.2457	0.3161	0.9826
Valor-p velocidad (m/s)	0.1708	0.9481	0.6149
Valor-p tiempo (min)	0.6771	0.6839	0.3672
Falta de ajuste	0.9165	0.5044	0.5548

* v : velocidad, T : temperatura, t : tiempo. Continuación de la tabla 6

Según los valores de falta de ajuste de cada una de las variables de respuesta superiores a 0.05, mostrados en la tabla 6, los modelos trabajados para hallar las condiciones de operación óptimas del equipo se adaptan al diseño Box-Behnken mediante el cual se hizo la optimización. Para analizar los datos obtenidos es importante tener claro que los valores ajustados para la velocidad (mostrados en la tabla 6) corresponden a un valor de velocidad de aire definidos por el productor del equipo, así entonces, para el valor de 4 se tiene una velocidad de aire de 2.03 m/s; para 7 la velocidad del aire es de 2.75 m/s; y 10 corresponde a 3.65 m/s. Analizando los datos, se evidencia que el producto al ser sometido a un secado con la temperatura más alta (80°C) no presentan caídas significativas en la variable maximizada del diseño (viabilidad promedio), inclusive el segundo valor más alto de esta variable se obtuvo bajo esta temperatura. Esto puede explicarse debido a que el ingrediente activo del producto son endoesporas de *B. subtilis* EA-CB0575, las cuales sobreviven en ese estado bajo temperaturas iguales o superiores a 80°C (Waites & Kay, 1970). Por otra parte, el valor más alto de la viabilidad promedio (9.1487 Log(UFC/g)) se logra en la corrida cuatro, la cual se trabaja con una velocidad de aire de 2.03 m/s (ajuste de velocidad 4), lo que podría indicar que este es el factor que mayor influencia tiene sobre las variables de respuesta. Así mismo, al comparar la corrida 4 con la 12 y la 3 con la 10 donde los únicos valores que cambian son los del tiempo de secado, se piensa que este factor presenta un efecto importante sobre las variables de respuesta pues en las corridas donde dicho valor es mayor, la viabilidad promedio es mayor mientras que la desviación estándar y el porcentaje de humedad son menores.

Analizando las tablas ANOVA y los diagramas de Pareto (Anexo E) se tiene que ninguno de los factores del diseño son significativos respecto a las variables de respuesta estudiadas, debido a que los valores-p son mayores a 0.05 (Tabla 6) y en los diagramas ninguno supera la línea de significancia.

Capítulo II

Después de hallar las gráficas de superficie de respuesta y los valores óptimos de cada una de las variables (Anexo E), se hizo una optimización multivariable obteniéndose la siguiente superficie de respuesta estimada.

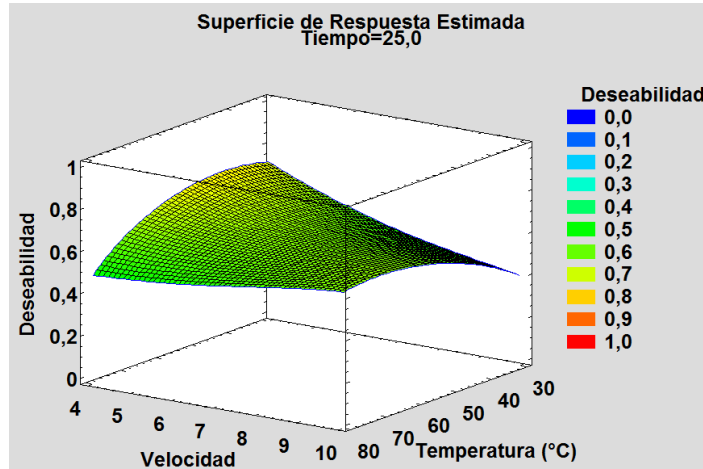


Ilustración 2. Superficie de respuesta de la deseabilidad

En la gráfica mostrada (Ilustración 2) se observa un comportamiento ascendente hacia la zona donde podrían encontrarse los candidatos a óptimos de las variables estudiadas. Allí también se indica que a la “deseabilidad” de 0.77 se encuentran los valores óptimos para cada una de las variables de respuesta. Para la velocidad del aire de secado es de 2.03 m/s (4), la temperatura de secado es de 46.1 °C y el tiempo de secado es de 32.8 minutos.

En la literatura se han reportado artículos donde se optimizan proceso de secado, algunos mediante el método de atomización y otros con el empleado en este estudio (lecho fluidizado). Entre estos estudios cabe mencionar el realizado por Arbari y colaboradores en el 2014 quienes optimizan las condiciones de un lecho fluidizado, cuyo interior se encontraba dividido en cuatro zonas, a nivel industrial para la producción de levadura, determinando que las temperaturas adecuadas para las zonas 1,2,3,4, que conforman el secador son 33°C, 31°C, 31°C y 29°C, respectivamente. En otro estudio, se encontraron las mejores condiciones de operación de un lecho fluidizado para el secado de un tipo de chile, hallándose que la profundidad del lecho adecuada es de 2 cm, con una temperatura de 70°C y una velocidad del aire de 1.09 m/s por un tiempo de operación de 80 minutos (Tasirin & Kamarudin, 2007). Para secado por atomización se menciona el trabajo de Yanéz-Mendizabal y colaboradores (2012) donde se determinó

entre otras variables, que la temperatura de secado adecuada para la producción de endoesporas generadas por la cepa *B. subtilis* CPA-8 es de 85°C, especificando allí también que esta bacteria resiste temperaturas mucho más altas que la encontrada (Yáñez-Mendizabal & Viñas, 2012).

Los resultados encontrados en este trabajo parecen estar acordes con los datos registrados en la literatura. Sin embargo, se debe tener claro que la optimización de un secador depende mucho de material que se va a procesar pues algunos de los ingredientes activos del producto pierden sus propiedades fácilmente al estar sometidos a altas temperaturas o a un periodo muy largo de secado así se tenga la temperatura adecuada. En el caso del lecho fluidizado es muy importante determinar la velocidad de aire indicada ya que una muy alta genera una fluidización violenta generada por burbujas de aire muy grandes lo que hace que las partículas aumenten la fricción entre ellas lo que genera una disminución en la calidad del producto; y por el contrario, si la velocidad de aire es muy baja, es posible que se requiera más tiempo para que se llegue a la velocidad mínima de fluidización, momento en el cual comienza la transferencia de calor y por tanto la pérdida de humedad del producto. Esto debe ir ligado de la profundidad del lecho a secar (Kadam, 1990).

2.3.3 Validación de los valores optimizados en las etapas de mezclado y secado

Después de realizar las optimizaciones de cada uno de los equipos se validaron los modelos obtenidos con los respectivos diseños de superficie de respuesta, para lo cual se llevaron a cabo dos corridas en diferentes tiempos. Para la mezcladora, el porcentaje de error entre el valor experimental (viabilidad promedio lograda en las corridas experimentales, Log(UFC/g)) y el valor hallado en las corridas de validación (viabilidad promedio Log(UFC/g)) fue de 11%, mientras que para el secador fue de 4.35%. Se observa que el modelo usado en la optimización de las condiciones de operación del secador tiene una precisión alta dando así seguridad en los valores calculados a partir de éste. Por otra parte, el porcentaje de error de la optimización de la mezcladora dio un poco alto lo que pudo deberse a la variación en las condiciones ambientales y errores humanos presentes durante ambas etapas (corridas experimentales y validación).

2.4 Conclusiones

Se optimizó la etapa de mezclado del proceso productivo de un bioinoculante con base en *B. subtilis* EA-CB0575, por medio del diseño CCD. Los valores óptimos encontrados fueron 133 rpm para la velocidad de mezclado y 46 minutos para el tiempo de mezclado, empleando los niveles 40-150 y 10-40 respectivamente. Al validarse los resultados se encontró un porcentaje de error del 11%. Se encontraron como condiciones óptimas de operación del secador empleado en la producción de un bioinoculante 4 (2.03 m/s) como la velocidad ajustada del equipo, 46.1 °C para la temperatura de secado y 32.8 minutos como el tiempo de secado, mediante el diseño de superficie de respuesta Box-Behnken, teniendo como niveles 4-7-10 (ajuste de la velocidad), 30-55-80°C (temperatura de secado) y 10-25-40 (tiempo de secado). La validación de estos resultados dio un porcentaje de error del 4.35%.

Capítulo III:

Evaluación de parámetros exigidos por la normatividad colombiana para la comercialización de un bioinoculante con base en *B. subtilis* EA-CB0575

Resumen

El Instituto Colombiano Agropecuario (ICA) estableció mediante la resolución 698 del 4 de febrero de 2011 las condiciones que deben cumplirse para la comercialización de bioinsumos agrícolas en el mercado colombiano. Entre estos requisitos está el análisis de propiedades fisicoquímicas correspondientes al tipo de formulación del producto mediante pruebas estipuladas en Normas Técnicas Colombianas (NTC). En este trabajo se hizo el análisis de la estabilidad durante 16 meses de almacenamiento, la humectabilidad, suspensibilidad y pH de un bioinoculante con base en *B. subtilis* EA-CB0575. Según la primera actualización de la NTC 439 ratificada en el 2015, se realizaron los procedimientos para determinar la suspensibilidad y humectabilidad del producto, obteniéndose un valor del 95.14% y 1 s respectivamente. Para la medición del pH se siguieron los pasos establecidos en la NTC 5527 del 2007, lográndose un valor de 8.35. Finalmente, para verificar que la concentración del ingrediente activo del producto no tuviera una variabilidad significativa durante el tiempo de evaluación (16 meses), se hizo el procedimiento basado en la NTC 5842 del 2011 con lo que se obtuvo un error de 0.042% entre los valores de viabilidad calculados cada mes, asegurándole así al agricultor una concentración de $1 * 10^9$ UFC/g en el momento de usarse el producto. Según los

criterios de aceptación o rechazo especificados en estas Normas Técnicas Colombianas, el bioinoculante analizado cumple con las propiedades evaluadas en este trabajo y necesarias para su comercialización.

Palabras claves: Bioinoculante, *Bacillus subtilis* EA-CB0575, Normas Técnicas Colombianas, humectabilidad, pH, suspensibilidad, viabilidad.

3.1 Introducción

Para la comercialización de productos biológicos en Colombia es necesario el cumplimiento de los requerimientos estipulados por el ICA (Instituto Colombiano Agropecuario) en la resolución 698 de 2011, en la cual se especifican las condiciones para el registro y el control de bioinsumos, entre las cuales se menciona una prueba de estabilidad desde la producción (tiempo cero) hasta el vencimiento del producto, definido por el productor. Además se requiere determinar las propiedades fisicoquímicas del inoculante como el pH, humectabilidad y suspensibilidad (ICA, 2011). Dichas propiedades fisicoquímicas son medidas mediante pruebas descritas en Normas Técnicas Colombianas (NTC) creadas por el ICONTEC (Instituto Colombiano de Normas Técnicas y Normalización), con el objetivo de facilitar la producción y el control de la calidad de los bioinsumos (Agentes, 1998).

La humectabilidad es el tiempo que se demora una muestra del inoculante a evaluar en mojarse totalmente, siguiendo las condiciones estándar reportadas en la norma NTC 439 de 2015. Por otra parte, la suspensibilidad se define como la cantidad de ingrediente activo suspendido en un líquido después de determinado tiempo y las características y requerimientos para su medición se detallan en la misma norma (Plaguicidas, 2006).

Para la medición del pH se deben seguir los parámetros contemplados en la norma NTC 5527 avalada en el 2007. El pH es una característica química que permite determinar la alcalinidad o acidez de dicho producto y es clave en el desarrollo de inoculantes (Behnood, Tittelboom, & De Belie, 2015).

Para evaluar la estabilidad del bioinoculante es necesario realizar un seguimiento de la viabilidad, es decir la cantidad del ingrediente activo contenida en el producto, para tener certeza que la concentración especificada por el productor será la misma durante su

almacenamiento y sobre todo en el momento de ser usado. Los detalles de medición de la estabilidad se aclaran en la resolución ICA 698 de 2011.

En este trabajo se evaluaron los parámetros requeridos por la normatividad colombiana para el desarrollo y aplicación de bioinsumos. En este caso se sometió un bioinoculante con base en *B. subtilis* EA-CB0575 a las pruebas de humectabilidad, suspensibilidad, estabilidad y pH siguiendo los procedimientos descritos en las correspondientes NTC, con el objetivo de verificar su aprobación o rechazo para una posible comercialización del mismo.

3.2 Materiales y métodos

Para las técnicas de medición de la humectabilidad, la suspensibilidad y el pH se tomaron muestras de un bioinoculante fabricado bajo las condiciones de operación óptimas de la mezcladora y el secador, halladas y explicadas en el capítulo 2. Se llevaron a cabo dos corridas obteniéndose en cada una de ellas 380 g de producto procesado

3.2.1 Evaluación de la humectabilidad de un bioinoculante con base en *B. subtilis* EA-CB0575

Para estas evaluaciones se tomaron dos muestras del bioinsumo de 5 ± 0.1 g cada una, y se pusieron por separado en un recipiente de 250 mL con 100 ± 1 mL de agua dura (cloruro de calcio dihidratado, cloruro de magnesio hexahidratado y agua destilada) a 30 ± 1 °C. Con la ayuda de un cronómetro se tomó el tiempo que tardó cada una de las muestras en sumergirse por completo en el agua, tiempo que debe ser menor o igual a un minuto (Plaguicidas, 2015).

Este procedimiento se detalla en el protocolo de humectabilidad (Anexo F).

3.2.2 Medición del pH de un bioinoculante con base en *B. subtilis* EA-CB0575

Para la medición del pH se tomaron 4 muestras de 10 ± 0.01 g cada una para realizar esta medición, dos muestras del bioformulado de la primera corrida y otras dos de la segunda. Las muestras se diluyeron, por separado, en 90 mL de agua destilada contenida en recipientes de 200 mL. Mientras éstas se diluían completamente se tomaron dos

Capítulo III

soluciones buffer marca Metrohm, uno de pH 4 y otro de 7, para calibrar el pHmetro Hanna Instruments pH 211 Microprocessor empleado para llevar a cabo esta técnica. Finalmente, después de verificar la calibración del equipo, se midió el pH de las soluciones preparadas mientras éstas se encontraban en agitación mediante el uso de un magneto y una plancha de agitación, con el fin de evitar la sedimentación del bioinoculante durante el tiempo de medición (Fertilizantes, 2007). El valor de esta propiedad es determinada por el productor. En el protocolo de pH (Anexo G) se presenta la explicación completa del procedimiento para realización de esta técnica.

3.2.3 Evaluación de la suspensibilidad de un bioinoculante con base en *B. subtilis* EA-CB0575

Para medir la suspensibilidad del producto se tomó una muestra de cada bioformulado con un peso de 16.7 g cada una para hacer dos suspensiones de concentración $2 * 10^8$ UFC/g, con lo cual se asegura que cuando el agricultor use el producto la concentración del producto sea igual o mayor a la especificada por el productor.

Una de las muestras se introdujo en un recipiente con 50 mL de agua dura (cloruro de calcio dihidratado, cloruro de magnesio hexahidratado y agua destilada), la cual se mezcló manualmente 120 veces por minuto aproximadamente, por un tiempo total de dos minutos. La suspensión obtenida se dejó en reposo durante 4 min en el baño María a 30°C y luego se transfirió a una probeta donde se completó el contenido hasta 250 mL con agua dura a 30°. Esta probeta con el contenido se giró 180° unas 30 veces de forma manual y se puso después en un horno a 30°C por 30 min. Finalmente se succionaron 225 mL de la suspensión con un sifón entre un tiempo aproximado de 10 a 15 segundos para descartarse, mientras que los 25 mL que quedaban en la probeta se pusieron en un horno a 80°C para evaporar el líquido y pesar el remanente sólido. Con los datos obtenidos se calculó el porcentaje de suspensibilidad usando la ecuación 4, cuyo valor debe estar entre 60% y 105% para ser aceptado (Plaguicidas, 2015). Todo este procedimiento se repitió con la otra muestra tomada. Para ver con mayor detenimiento los pasos a seguir de esta técnica, dirigirse al protocolo de suspensibilidad (Anexo H).

$$\% \text{ suspensibilidad} = \frac{10}{9} * \frac{100(c - Q)}{c} = \frac{111(c - Q)}{c} \quad (4)$$

Dónde:

c: masa del ingrediente activo en la probeta completa $\left(\frac{a+b}{100}\right)$

a: Porcentaje en masa del ingrediente activo en la muestra

b: masa de la muestra adicionada a la probeta en g

Q: masa del ingrediente activo de los 25 mL restantes en la probeta (en g)

3.2.4 Seguimiento de la viabilidad del ingrediente activo de un bioinoculante con base en *B. subtilis* EA-CB0575

Con el fin de evaluar la viabilidad del ingrediente activo entre su producción (tiempo cero) y los 16 meses, se preparó un lote de bioformulado del cual se tomaban muestras de 1 g en los meses que se deseaban evaluar (mes 0, 1, 2, 3, 4, 6, 8, 16). A todas las muestras tomadas se les hicieron diluciones seriadas hasta 10^{-7} y se sembraron por superficie en cajas TSA al 50%, las cuales se incubaron a 30°C por 24 h, tiempo en el que se contaron las unidades formadoras de colonia por gramo Log(UFC/g) (Bioinsumos, 2011). Los resultados obtenidos para cada mes evaluado se llevaron a la forma logarítmica y luego se representaron mediante una gráfica de barras con porcentaje de error, hecha mediante el uso del software Microfost Excel 2010.

3.3 Resultados

3.3.1 Humectabilidad

Siguiendo las condiciones de la NTC 439 (primera actualización) se ejecutó la técnica de humectabilidad de un bioinoculante teniendo como resultado un tiempo de 1.25 segundos (tres repeticiones) para que la muestra del producto se humectara por completo en el líquido. Este tiempo se encuentra en el rango determinado por el ICONTEC en la NTC creada para su análisis, el cual es igual o menor a un minuto (Plaguicidas, 2015).

En ensayos realizados con una formulación pesta en el laboratorio de Biotecnología de la Universidad EAFIT, se obtuvo un tiempo de 16 segundos aproximadamente para la humectabilidad, valor que difiere notablemente con el alcanzado en este estudio. Una

Capítulo III

posible razón de esta diferencia está en los componentes de la formulación de ambos productos, ya que adyuvantes como los surfactantes adicionados a éstos permiten la disminución de la tensión superficial entre las partículas sólidas y la interfaz sólido/líquido (Garad & Wang, 2010).

Esta propiedad es de gran importancia principalmente para formulaciones de gránulos y polvos mojables ya que es el inicio del proceso de reconstitución, la cual es definida como el tiempo en que tarda el sólido en descomponerse para formar una solución (Forny & Marabi, 2011), que para este caso es de gran importancia porque de esta manera el agricultor reduce el tiempo de preparación del producto para su uso. Lo ideal es que el sólido se sumerja en el líquido rápidamente (Oostveen & Meesters, 2015), por lo que se puede decir que el inoculante biológico analizado tiene una humectabilidad aceptable debido al corto tiempo que tomó en esta prueba.

3.3.2 Suspensibilidad

Para la medida de esta técnica se hizo el procedimiento descrito en la primera actualización de la NTC 439, con lo cual se obtuvo un resultado de 95.14% (dos repeticiones), valor que se encuentra dentro del rango estipulado en la norma (60%-105%).

El bioinoculante con base en *B. subtilis* WP fabricado por Yaser S.A.S, empresa colombiana, cumple la normatividad colombiana y tiene una suspensibilidad entre 80% y 100%. Uno de los primeros prototipos de formulación Pesta con otros microorganismos como ingrediente activo, desarrollados en el laboratorio de Biotecnología de la Universidad EAFIT, tenía un porcentaje de suspensibilidad del 57% valor que no cumplía con la normatividad colombiana (Toro & Garcés, 2009).

Esta variable es de gran importancia para la eficiencia del producto al ser empleado por el agricultor, ya que una buena suspensión del ingrediente activo en el líquido garantiza dosis de similar concentración en todo el lecho del líquido, a su vez logra que los adyuvantes se homogenicen en la suspensión; lo que le permite al cliente adicionar en diferentes áreas del cultivo cantidades parecidas de ingrediente activo (Garad & Wang, 2010). Esta normativa está basada en la regulación dada por las entidades internacionales CIPAC (Collaborative International Pesticides Analytical Council Limited) y la FAO (Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura), como

ocurre en otros países como Nicaragua y Costa Rica, lugares donde el procedimiento que se debe llevar a cabo para medir esta propiedad es igual a la NTC 439.

3.3.3 pH

El pH del bioformulado evaluado en este estudio tuvo un valor de 8.345, el cual difiere con los especificados en productos biológicos ya comerciales tales como el *B.subtilis* WP fabricado por Yaser S.A.S que tiene un pH entre 5.5 y 7; el FZB24®- WG cuyo ingrediente activo es *B. amyloliquefaciens* y su valor de pH está entre 6.5 y 7; y un pesticida biológico con *B. subtilis* como microorganismo presenta un valor de 7.3 en su pH (Chen & Guo, 2014). Además de estos, una formulación Pesta diseñada en el laboratorio de Biotecnología de la Universidad EAFIT, presentó un valor de pH menor al obtenido con este bioinoculante, el cual fue de 7.04. Quizá esta diferencia de valores radique en el tipo de microorganismo y formulación de cada producto, ya que esta propiedad evita que se presenten contaminantes y genera estabilidad en el producto (Burges, 1998).

Para esta propiedad hasta el momento no hay un criterio de aceptación o rechazo, solo se especifica en la NTC 5842 que los productores de inoculantes biológicos elaborados con microorganismos promotores de crecimiento vegetal tanto en formulación sólida como líquida, deben determinar el valor de esta propiedad y detallarlo en la descripción del producto.

3.3.4 Viabilidad

Con el fin de evaluar la estabilidad del ingrediente activo contenido en el producto, se hizo un seguimiento de su viabilidad durante 16 meses. Las muestras tomadas en cada uno de los meses a analizar pertenecían a un mismo lote de producción. Según los datos obtenidos y mostrados en la figura 4, en el mes cero se tenía una concentración de 9.590 Log(UFC/g seco) y para el mes siguiente esta variable tenía un valor de 9.504 Log(UFC/g seco), presentándose una reducción del 0.086. Para el último mes de evaluación (mes 16), la viabilidad fue de 9.344 Log(UFC/g seco), teniendo una diferencia entre el mes cero y éste de 0.246. Se tiene entonces que la viabilidad promedio es de 9,422 Log(UFC/g seco) con un error promedio del 0,042% entre los resultados obtenidos de todos los meses, lo que indica un buen ajuste y homogeneidad de las muestras evaluadas. Adicionalmente, se observa una alta pureza del producto a través del tiempo al no tener

presencia de contaminantes en él (datos no mostrados). Con estas condiciones del producto se puede decir que se cumple con lo reglamentado en la NTC 5842 (2011) y con la resolución 698 del ICA (2011), donde se especifica que el producto debe tener un grado de pureza del 95% y su viabilidad no debe disminuir de tal manera que no le pueda garantizar al agricultor la especificada en el producto.

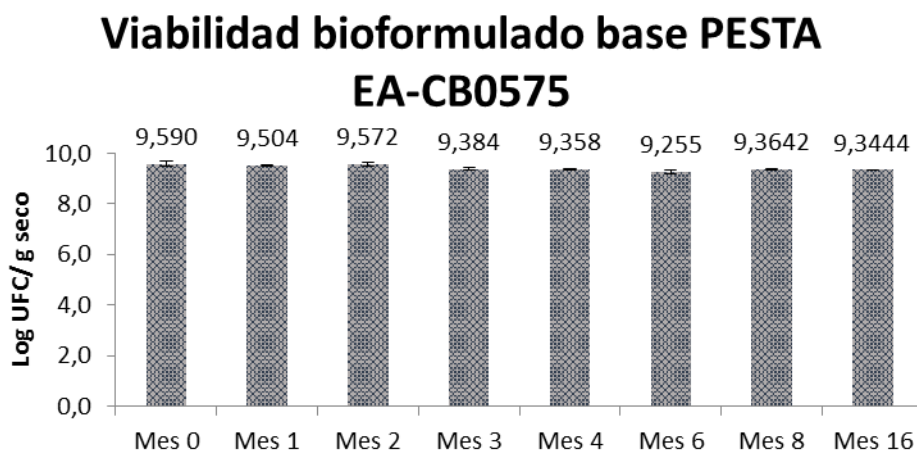


Ilustración 3. Evaluación de la estabilidad de un bioinoculante con base en *B. subtilis* EA-CB0575 por 16 meses

3.4 Conclusión

Se evaluó la estabilidad, la humectabilidad, la suspensibilidad y el pH de un bioinoculante con base en *B. subtilis* EA-CB0575 teniendo como base las Normas Técnicas Colombianas correspondientes a cada propiedad. Se obtuvo como resultado un 95.14% en la suspensibilidad, un tiempo de humectabilidad de 1.25 s, un pH de 8.34 y un error del 0.042% en la estabilidad del producto evaluada durante 16 meses. Según los resultados logrados y los criterios de aceptación o rechazo estipulados en las NTC, el bioinoculante evaluado cumple con los análisis fisicoquímicos aquí evaluados, los cuales son requisito para una probable comercialización.

4. Conclusiones y recomendaciones

4.1 Conclusiones

Se desarrolló un protocolo donde se describe el procedimiento que se debe llevar a cabo en la etapa de granulación en el proceso productivo de un bioinoculante con base en *B. subtilis* EA-CB0575. En este documento, se detallan los pasos del ensamble del equipo, la limpieza del mismo antes y después de su uso, la explicación de cómo manipularlo durante el proceso de extrusión y finalmente se dan unas recomendaciones de mantenimiento y prevención. Todo este desarrollo se sigue también mediante imágenes que pretenden facilitar la comprensión por parte del lector.

Se optimizaron las condiciones de operación de la mezcladora Actum modelo AML 1000 mediante el diseño de superficie de respuesta CCD con dos factores (velocidad de mezclado y tiempo de mezclado) y dos niveles para cada factor (velocidad de mezclado: 40 y 150 rpm, tiempo de mezclado: 10 y 40 min). Se obtuvieron como valores óptimos 133 rpm y 46 minutos, denotando también que el factor que presenta una mayor influencia en la variable de respuesta (viabilidad promedio Log(UFC/g)) es la velocidad de mezclado. El porcentaje de error encontrado en la validación hecha para verificar los valores encontrados con el diseño usado fue de 11%.

Se encontraron las condiciones óptimas de operación del secador de lecho fluidizado Sherwood Scientific usado para la producción de un bioinoculante, empleando un diseño Box-Bhenken con los factores de temperatura de secado (30, 55 y 80°C), ajuste de la velocidad del aire (4, 7 y 10) y el tiempo de secado (10, 25 y 40 min.). Los valores óptimos fueron 4 ajuste de la velocidad de secado, la cual es equivalente a 2.03 m/s; 46.2°C y 33 minutos. Por los resultados obtenidos, se analizó que la temperatura no tiene un efecto

considerable en la viabilidad de la bacteria contenida en el producto. Para corroborar estos valores se hizo una validación cuyo valor fue de 4.35%.

Se midieron las propiedades de humectabilidad, suspensibilidad, pH y estabilidad del producto, basándose en las Normas Técnicas Colombianas (NTC). Se obtuvo un valor de 1 segundo para la humectabilidad, 95.14% para la suspensibilidad, 8.35 de pH y una viabilidad promedio de $1 * 10^9$ UFC/g con un porcentaje de error de 0.042%.

Se determinó que todas las propiedades cumplen con el criterio de aceptación estipulado por la norma, resaltando que el valor del pH es especificado por el productor. Así entonces, el producto cumple con las condiciones fisicoquímicas para poder ser comercializado

4.2 Recomendaciones

Realizar pruebas con un control negativo con un microorganismo no esporulante para poner en evidencia las ventajas del producto con base en *B. subtilis* EA-CB0575.

Medir la viabilidad del ingrediente activo en cada una de las etapas del proceso productivo para determinar la variabilidad de esta propiedad en el producto.

Evaluar el pH del producto usando agua destilada y agua dura, con el fin de determinar el efecto que dichas aguas causan en el resultado.

Hacer ensayos con el bioinoculante optimizado para reducir el valor del pH

Anexos

Anexo A: protocolo de mezcla de sólidos para la producción de un bioinoculante con base en *B. subtilis* EA-CB0575

1. OBJETIVO:

Establecer el proceso de mezcla de sólidos para el desarrollo del bioinoculante con base en *Bacillus subtilis* EA-CB0575.

2. DESCRIPCIÓN:

2.1. Principio de la técnica

La mezcla de sólidos es una operación unitaria donde se busca que todas las partículas involucradas estén en contacto unas con otras, ésta es influenciada por las características de flujo de los polvos, la forma de las partículas y su distribución de tamaño (Shenoy & Innings, 2015). Los mecanismos conocidos para llevar a cabo este proceso son: a) mezcla convectiva, en la cual un grupo de partículas se mueve de un punto a otro dentro del mezclador; b) mezcla de difusión, donde se da el movimiento aleatorio de las partículas en forma individual; y c) mezcla de cizalladura, a través de la cual grupos de partículas son combinados mediante la formación de planos de deslizamiento (Ortega, 2012).

Para el caso de la mezcla líquido-sólido es de gran importancia la homogeneidad de la misma para definir bien las propiedades del producto final.

Por ejemplo, en la industria farmacéutica es esencial lograr una concentración correcta del ingrediente activo en el producto para evitar la generación de tabletas sobre o sub potentes. La adición del líquido a la mezcla de sólidos se da por tres mecanismos principales, el primero de ellos consiste en verter el líquido dentro de la mezcladora que contiene los sólidos, el segundo es atomizar el mismo y el tercero es agregarlo en forma de vapor, que se condensará en el momento que entre en contacto con los sólidos (Slettengren & Heunemann, 2015).

Algunos de los puntos críticos a tener en cuenta en el momento de mezclar son: a) manejo del material, se refiere a la correcta formulación de los componentes que se desean procesar; b) tiempo de mezclado, del cual se debe determinar su óptimo de forma experimental, mediante la toma de muestras de distintos puntos del equipo a diferentes tiempos de mezclado; y c) volumen de la mezcla, indica la cantidad adecuada de material para realizar el procedimiento, pues un valor por encima o por debajo del volumen apropiado implica una mezcla incorrecta de los sólidos (Clark, 2009).

2.2. Equipos para el mezclado de los sólidos del bioformulado base pesta

Mezcladora Actum modelo AML 1000 serie B2 para bioformulado

Autoclave modelo EA 620 serie 620-8802-0317

Balanza analítica

2.3. Reactivos

Etanol al 96%

Desengrasante bactericida Dobesan ultra

2.4. Materiales

Bolsas plásticas

Papel kraft

Tijeras

Guantes de nitrilo

Papel toalla para limpiar

Componentes sólidos del bioformulado base pesta

Cinta de enmascarar

3. DESARROLLO DEL PROCESO

3.1. Esterilización del material

- Pesar la cantidad especificada de cada uno de los sólidos que comprende el bioformulado (161 g de sHt01, 26 g de sCa02, 52 g de sBt03, 3.9 g de sCN04, 12 g de sC05 y 7.7 g de sGX06)
- Almacenar en doble bolsa plástica cada porción de sólido, envolverlo y asegurarlo con cinta de enmascarar.
- Cortar un pedazo de papel kraft, suficiente para envolver las dos aspas de la mezcladora, y asegurarlo con cinta de enmascarar.
- Poner tanto los sólidos como las aspas del equipo envueltas a esterilizar, a 121°C y 15 psig por 15 minutos, en el autoclave EA 620 serie 620-8802-0317.

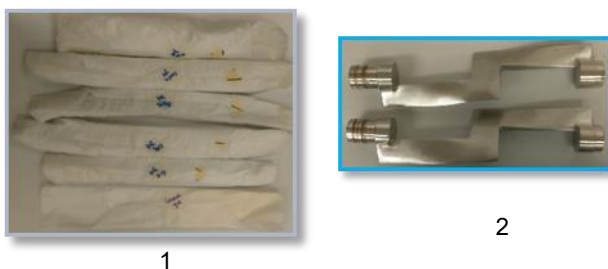


Figura 1. Material esterilizado. 1: sólidos envueltos en bolsa plástica, 2: aspas del equipo

3.2. Limpieza y ensamble del equipo

- Rociar desengrasante Dobesan ultra en la cámara de mezclado, donde se lleva a cabo el proceso. Esparcirlo con papel, procurando que éste llegue hasta las esquinas y lugares más difíciles de la cámara.

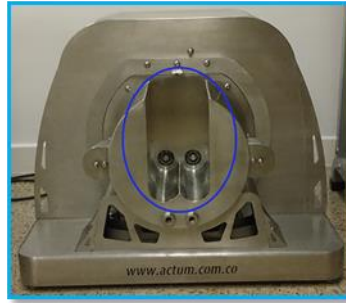


Figura 2. Mezclador marca Actum modelo AML 1000 serie B2. La cámara de mezclado está señalada dentro de un círculo azul

- Rociar la cámara de mezclado con etanol al 96% y dejar que el etanol se seque por sí solo. Asegurarse de haber depositado etanol en los orificios donde se ajustan las espas.

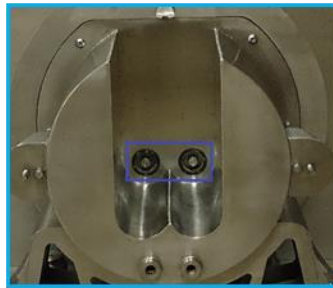


Figura 3. Cámara de mezclado. En el recuadro azul se señalan los orificios donde se ajustan las espas del equipo

- Limpiar con desengrasante bactericida Dobesan ultra y etanol la tapa de la cámara de mezclado.



Figura 4. Tapa del mezclador con agujeros en el medio para darle soporte a los ejes.

Anexos

- Desenvolver las aspas del papel kraft y con los guantes de nitrilo puestos, ajustarlas a presión en los soportes de la tapa del mezclador. Tener en cuenta que el asa señalada con un tallado circular pequeño debe encajarse en el soporte que lleve esa misma marca.



Figura 5. Aspas del mezclador. 1: indica cómo se deben instalar las aspas y 2: muestra cómo deben quedar las aspas ya encajadas

- Rociar con etanol las aspas y la tapa
- Acoplar la tapa, con las aspas ya ubicadas correctamente, en la cámara de mezclado. Para ello, el extremo de las aspas que tienen un orificio en forma de hexágono, deben encajar en los tornillos ubicados dentro de la cámara.

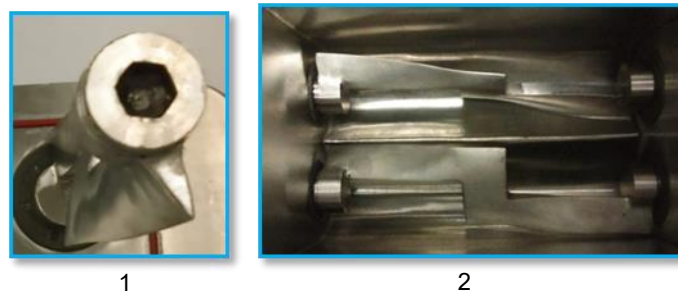


Figura 6. Aspas de la mezcladora con sus orificios. 1: Orificio hexagonal de las aspas y 2: ubicación correcta de las aspas en la cámara de mezclado.

- Colocar y apretar las perillas en la parte externa de la tapa para asegurarla

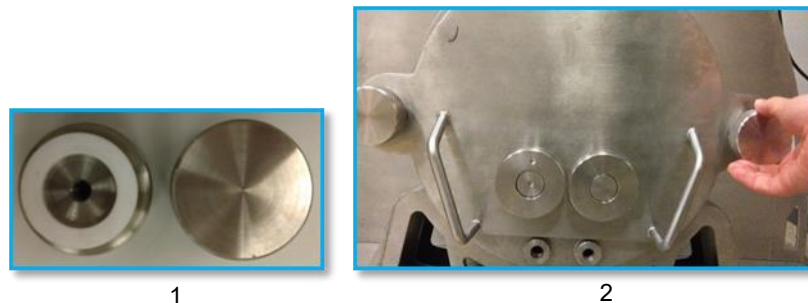


Figura 7. Perillas de las aspas de la mezcladora. 1: Perillas del equipo y 2: ubicación de las perillas en la tapa del equipo.

- Poner la tapa de registro sobre la cámara de mezclado, encajando la perilla de la tapa entre el soporte que está adherido al equipo. Ajustarla solamente en el momento en que se desee iniciar el proceso de mezclado, pues ésta posee una pequeña palanca que presiona el botón que activa el funcionamiento del equipo, cuando éste está prendido.



Figura 8. Tapa de registro de la mezcladora

3.3. Proceso de mezclado

- Conectar el equipo al tomacorriente y encenderlo poniendo en posición vertical el interruptor negro. Fijar la velocidad a 133 rpm, presionando los botones donde la flecha que señala hacia arriba aumenta la velocidad, y la otra la disminuye.



Figura 9. Control de la mezcladora

- Desenvolver las bolsas plásticas y disgregar los grumos que hayan aparecido luego de la esterilización debido al calor en el autoclave.
- Cortar con unas tijeras la esquina de cada una de las bolsas para luego depositar los sólidos en el equipo por una de las aberturas de la tapa de registro.



Figura 10. Tapa de registro donde se resalta una de sus aberturas

- Cuando se hayan depositado todos los sólidos, ajustar la tapa de registro apretando su perilla hacia la derecha, con lo cual dará inicio el proceso de mezclado.



Figura 11. Botón presionado por la palanca de la tapa de registro para dar inicio al proceso de mezclado

- Después de dos minutos de mezclado de los sólidos, verter por las aberturas de la tapa de registro la suspensión bacteriana en forma constante.



Figura 12. Vaciado de la suspensión bacteriana a la cámara de mezclado

- Después de cronometrar 46 minutos, desde el momento en que se adicionó la suspensión bacteriana a los sólidos, apagar el equipo y quitar la tapa de registro para extraer la masa formada, procurando no contaminarla. No olvidar usar los guantes para manipular el producto.



Figura 13. Masa formada en el proceso de mezclado

3.4. Limpieza y desensamble del equipo

- Cuando se haya retirado toda la masa del mezclador, se apaga el equipo y se desconecta al tomacorriente.
- Retirar las dos perillas que están en los extremos de la tapa de la cámara de mezclado.

Anexos

- Halar la tapa de la cámara de mezclado con movimientos pequeños hacia los lados.
- Remover las aspas halando de éstas, ya sea de la tapa o de los orificios de la cámara.
- Retirar toda la masa que haya quedado adherida a las aspas, la cámara de mezclado y la tapa. Luego limpiarlas con una esponja suave y jabón de loza.
- Rociar desengrasante Dobesan ultra en las partes ya limpias y esparcirlo con papel hasta que éste haya desaparecido. Repetir el mismo procedimiento con etanol al 96%.

4. RECOMENDACIONES

- No limpiar el equipo con hipoclorito de sodio ni con una esponja áspera debido a que éste puede oxidarse.
- No introducir las manos a la cámara de mezclado mientras las aspas estén en funcionamiento.
- Lavar las aspas con cuidado para no lastimarse
- No ingresar o adicionar dentro de la cámara de mezclado ningún objeto ajeno a los componentes del bioformulado, mientras esté en funcionamiento el equipo.
- Si por algún motivo el equipo está en funcionamiento y las aspas se atascan y dejan de girar de forma repentina, apagarlo e informar inmediatamente a la persona que esté a cargo del equipo.
- Hacer una limpieza profunda del equipo antes de usarlo para evitar alguna contaminación en el producto como se mencionó en el numeral 3.2.

Anexo B: proceso de granulación para la producción de un bioinoculante con base en *B. subtilis* EA-CB0575

1. OBJETIVO:

Establecer el proceso de granulación para el desarrollo del bioinoculante con base en *Bacillus subtilis* EA-CB0575.

2. DESCRIPCIÓN

2.1. Principio de la técnica

La granulación es un proceso de aumento de tamaño donde las partículas entran en contacto y forman enlaces entre sí dando como resultado aglomerados que reciben el nombre de gránulos. Sus principales objetivos son: mejorar la fluidez y compresibilidad de los sólidos, reducir la producción de polvo, aumentar la densidad aparente y evitar la segregación de los materiales después de la mezcla (Saleh & Dhenge, 2015).

Esta operación unitaria ha sido muy empleada en las industrias y se ha ido perfeccionando cada vez más. Por ejemplo, es empleada para la producción de fármacos, pellets de fertilizantes, aglomeración de fibras de madera para la industria papelera, pelletización de hierro, entre otros (Cleary & Sinnott, 2008). Por lo general, este proceso se puede clasificar en dos clases: seco y húmedo (Saleh & Dhenge, 2015).

En el caso de la vía seca, las partículas son comprimidas a una presión alta para luego reducir su tamaño mediante la opresión de dos rodillos (Dhenge & Fyles, 2010). Por otra parte, en la vía húmeda es adicionado un líquido, ya sea agua sola o con algún aglutinante, el cual cumple la función de crear puentes entre las partículas sólidas generando así fuerzas cohesivas que permiten finalmente la formación de los aglomerados (Cleary & Sinnott, 2008).

Anexos

La producción de gránulos húmedos cuenta con cuatro pasos principales, los cuales son: 1) combinación, consiste en la mezcla de los sólidos con el líquido que va a actuar como aglutinante; 2) extrusión, es pasar la mezcla húmeda a través de dispositivos que le dan la forma deseada; 3) esferonización, donde la masa extruida es cortada para obtener el tamaño requerido; y 4) secado, los pellets pierden cierto porcentaje de humedad mediante el uso de determinados equipos (D. Wilson & Rough, 2007).

La etapa de extrusión se puede llevar a cabo mediante un proceso continuo o batch. En el primero de éstos se clasifican dos equipos principales que son: de un solo tornillo o de doble tornillo. Para ambos casos, la masa es compactada y transportada a través de los tornillos hasta llegar a un plato por donde es forzada a pasar generando finalmente la forma deseada (Sharma, Mulvaney, & Rizvi, 2000). En el caso del proceso batch, la masa húmeda se procesa mediante el llamado “acción de limpieza” el cual consiste en comprimir el material y hacerlo pasar entre un tamiz o una canasta con múltiples orificios. Dicha acción de limpieza se puede llevar a cabo a través de la rotación de una de las partes del equipo (D. Wilson & Rough, 2007).

2.2. Equipos

Granulador tipo Benchtop modelo KAR-75 de 1 mm de diámetro

Autoclave modelo EA 620, serie 620-8802-0317

2.3. Reactivos

Etanol al 96%

Desengrasante bactericida Dobesan ultra

2.4. Materiales

Papel kraft

Guantes de nitrilo

Papel toalla para limpiar

Llave inglesa boca fija de 8 in

Recipiente metálico

Cinta de enmascarar

3. DESARROLLO DEL PROCESO

3.1. Esterilización del material

- Cortar un pedazo de papel kraft, suficiente para envolver las piezas del equipo por separado (Figura 1) y asegurarlo con cinta de enmascarar.
- Poner en el autoclave los paquetes organizados para esterilizarlos a 121°C Y 15 psig por 15 minutos.



Figura 1. Piezas del granulador que deben ser esterilizadas
(Nombradas de izquierda a derecha: Tornillos, aspas de extrusión, matriz circular, tolva de alimentación, émbolo)

3.2. Limpieza y ensamble del equipo

- Rociar desengrasante sobre todo el cuenco de acero inoxidable, donde se reciben los gránulos formados durante el proceso. Asegurarse, también, de limpiar el canal de descarga, el cual se presenta a continuación



Figura 2. Cuenco de acero inoxidable, cuyo orificio es el canal de descarga

- Rociar el cuenco con etanol al 96% y dejar que se seque por sí solo
- Desenvolver, con los guantes de nitrilo puestos, las piezas del equipo y rociarlas con etanol al 96%.

Anexos

- Insertar la matriz circular en el eje central del cuenco, y después de ubicarlo correctamente, girarlo un poco hacia la izquierda hasta que el pasador del mismo haga contacto con el pin del cuenco.

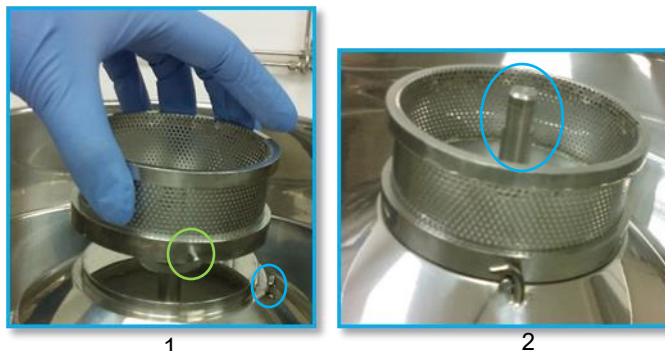


Figura 3. Ensamble de la matriz circular. Parte 1: Se señala el pin con azul y el pasador con verde. Parte 2: se señala el eje

- Encajar las aspas de extrusión al eje del granulador, verificando que los agujeros de dichas aspas queden en contacto con la parte plana del eje.



Figura 4. Acople de las aspas de extrusión en el eje del equipo

- En los agujeros de las aspas ubicar los tornillos y apretarlos con la llave inglesa boca fija de 8 pulgadas.



Figura 5. Forma de asegurar las aspas de extrusión

- Colocar la tolva de alimentación sobre la matriz circular.



Figura 6. Ubicación de la tolva de alimentación

3.3. Proceso de granulación

- Conectar el equipo al tomacorriente y ajustar el control de velocidad en cero, presionar el interruptor e incrementar la velocidad lentamente para verificar que las aspas no chocan con la matriz circular.



Figura 7. Control de velocidad e interruptor del granulador.

- Apagar el equipo y depositar de forma gradual en la tolva de alimentación, porciones de 1 a 2 cm de diámetro de la masa previamente procesada en la mezcladora.



Figura 8. Masa depositada en la tolva de alimentación

- Cuando se haya llenado la mitad de la tolva con la masa, ajustar la velocidad a 9 rpm y presionar el interruptor negro para comenzar el proceso de granulación.



Figura 9. Interruptor que enciende el equipo granulador

- Poner el émbolo dentro de la tolva y hacer una presión suave y constante con éste, para que la masa quede entre las espas y la matriz circular, momento en el cual comenzaran a formarse las tirillas de masa. Al principio éstas no serán completamente cilíndricas porque los agujeros de la matriz no estarán llenos totalmente.



Figura 10. Émbolo que ayuda a agilizar el proceso de granulación

- Después de verificar que haya masa en toda la matriz circular y, por consiguiente, los agujeros de la misma estén llenos, contar 40 segundos desde el momento en que comienzan a salir bien formadas las tirillas. Cuando culmine dicho tiempo, detener el proceso y de una forma delicada, haciendo uso de los dedos cortar las tiras de masa extruidas que salen por la parte externa de la matriz.



Figura 11. Masa extruida

- Repetir el mismo procedimiento desde el segundo paso del numeral 3.3 hasta que se haya extruido toda la masa.
- Almacenar todos los gránulos obtenidos en el recipiente metálico, previamente desinfectado.



Figura 12. Recipiente metálico

3.4. Limpieza y desensamble del equipo

- Apagar el equipo y desconectarlo del tomacorriente
- Remover el émbolo y la tolva de alimentación
- Aflojar los tornillos que ajustan las aspas con la llave inglesa de boca fija
- Retirar las aspas y la matriz cilíndrica
- Limpiar con desinfectante y luego etanol al 96% la cuenca incluyendo el canal de descargue.
- Lavar con jabón y un cepillo de cerdas suaves, todas las piezas extraíbles del equipo procurando eliminar cualquier cantidad de masa que haya quedado en ellas. Dejarlas secar hasta su próximo uso.

4. RECOMENDACIONES

- No introducir los dedos dentro de la matriz circular mientras el equipo esté en funcionamiento.
- No emplear otros elementos para aprisionar la masa dentro de la matriz circular, ni ejercer con fuerza excesiva el uso del émbolo.
- No retirar la tolva de alimentación mientras el proceso se esté llevando a cabo.
- No sobrecargar la tolva de alimentación con la masa a procesar ya que esto puede provocar una sobrecarga de energía.
- Además de presionar el émbolo durante el proceso de extrusión, sostener la tolva de alimentación para que no se desajuste.
- Se pueden adaptar las aspas hasta máximo 1 mm de distancia con la matriz. Para ello se deben aflojar los tornillos de las aspas y deslizarlas hasta la distancia deseada, luego asegurarlas atornillando nuevamente los pernos.
- No alimentar el equipo con pedazos de masa muy grandes ya que pueden generar daños en los agujeros de la matriz.
- Para asegurarse que la masa llegue a toda la matriz, se recomienda que durante el proceso, el émbolo se mueva de forma circular al mismo tiempo que se hace presión hacia abajo.
- No limpiar ninguna parte del equipo con hipoclorito de sodio.

Anexo C: Proceso de secado para la producción de un bioinoculante con base en *B. subtilis* EA-CB0575

1. OBJETIVO:

Estandarizar el proceso de secado para el desarrollo del bioinoculante con base en *Bacillus subtilis* EA-CB0575.

2. DESCRIPCIÓN:

2.1. Principio de la técnica

El secado se define como la eliminación de cantidades pequeñas de agua u otros líquidos orgánicos de materiales a procesar (Geankoplis, 1998), por lo general se lleva a cabo seguida de una etapa de evaporación, filtración o cristalización, y antes del envasado del producto (Coulson & Richardson, 1981). Esta operación unitaria se realiza con el fin de reducir costos de transporte, facilitar el manejo de ciertos materiales, prevenir el crecimiento de microorganismos y enzimas que afecten el producto y darle a éste una vida útil mayor (Coulson & Richardson, 1981; Geankoplis, 1998). Sin embargo, si no se tienen las condiciones de secado adecuadas para cada tipo de material, el producto sufrirá modificaciones químicas, estructurales, biológicas y mecánicas (Naidu & Vadashree, 2015).

Los métodos que se emplean para secar materiales se clasifican en tres grupos, en el primero están aquellos donde el vapor de agua se forma por el contacto directo del material con aire caliente; en el segundo el calor formado se da de forma indirecta mediante una pared metálica o por radiación; y en el último, el agua del material congelado pasa de estado sólido a gaseoso de forma directa (Geankoplis, 1998).

Para productos biológicos, las técnicas comúnmente usadas son liofilización, secado por aspersión y lecho fluidizado. La primera mencionada a pesar de ser la más

Anexos

efectiva para mantener la calidad de las condiciones del producto es la menos aplicada debido a sus altos costos; la segunda es generalmente usada para formulaciones líquidas y la última es empleada para formulaciones sólidas (Burges, 1998).

2.2. Equipos

Secador de lecho fluidizado

2.3. Reactivos

Etanol al 96%

Desengrasante Dobesan ultra

2.4. Materiales

Bioformulado extruido

Papel toalla para limpiar

Guantes de nitrilo

3. DESARROLLO DE LA TÉCNICA:

- Rociar desengrasante en el tubo metálico y esparcirlo con papel toalla hasta que se seque. Repetir la misma operación con etanol al 96%
- Instalar el tubo metálico en la base del equipo, asegurándose que los pines ubicados en la parte inferior del tubo se acoplen a la base dándole un pequeño giro hacia la derecha.
- Vaciar el producto en el tubo metálico, de forma delicada y con los guantes de nitrilo puestos.
- Después de tener todo el contenido dentro del tubo, poner en la parte superior del mismo la bolsa protectora para evitar fugas del producto debido a la fluidización del equipo.
- Conectar el equipo al tomacorriente y presionar el botón de encendido color rojo.



Figura 1. Interruptor de encendido

- Ajustar la temperatura y velocidad deseada para el proceso de las perillas correspondientes.



Figura 2. En la imagen de la izquierda se señala el botón de temperatura y la imagen de la derecha se muestra el botón de la velocidad

- Presionar el botón “start” y después de culminado el tiempo de secado definido previamente, presionar el botón “stop”.
- Desajustar el tubo metálico, retirarle la bolsa de protección y vaciar el producto seco en una bolsa plástica para su almacenamiento en nevera.
- Limpiar el tubo metálico con desengrasante y etanol al 96%
- Apagar el equipo y desconectarlo del tomacorriente

Anexo D: Resultados de la optimización de la mezcladora

- Viabilidad promedio (Log(UFC/g))

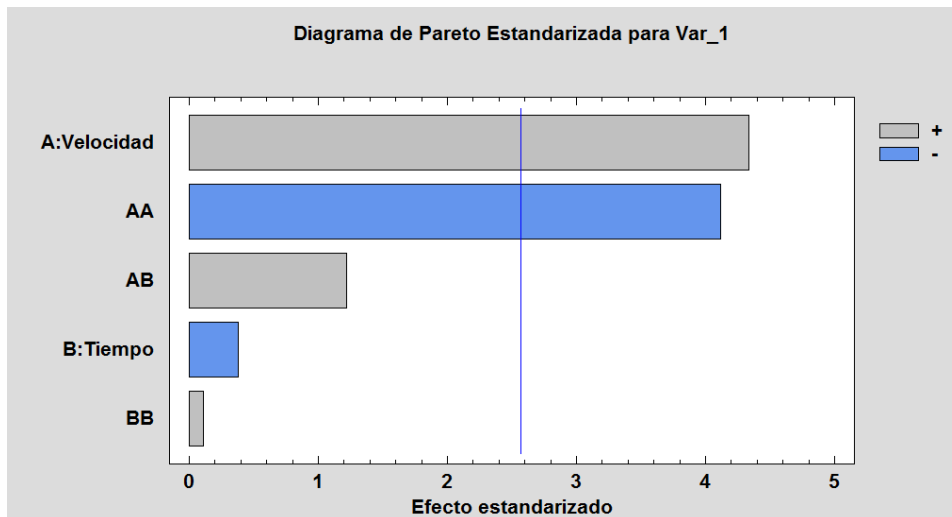


Figura 1. Diagrama de pareto de la viabilidad promedio

Análisis de Varianza para Var_1

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
A:Factor_A	0,350131	1	0,350131	18,78	0,0075
B:Factor_B	0,00270173	1	0,00270173	0,14	0,7191
AA	0,316304	1	0,316304	16,97	0,0092
AB	0,0276224	1	0,0276224	1,48	0,2778
BB	0,000235381	1	0,000235381	0,01	0,9149
Error total	0,0932143	5	0,0186429		
Total (corr.)	0,825738	10			

R-cuadrada = 88,7114 por ciento
 R-cuadrada (ajustada por g.l.) = 77,4228 por ciento
 Error estándar del est. = 0,136539
 Error absoluto medio = 0,0711347
 Estadístico Durbin-Watson = 1,56921 (P=0,2489)
 Autocorrelación residual de Lag 1 = -0,0361457

Figura 2. Tabla ANOVA de la viabilidad promedio

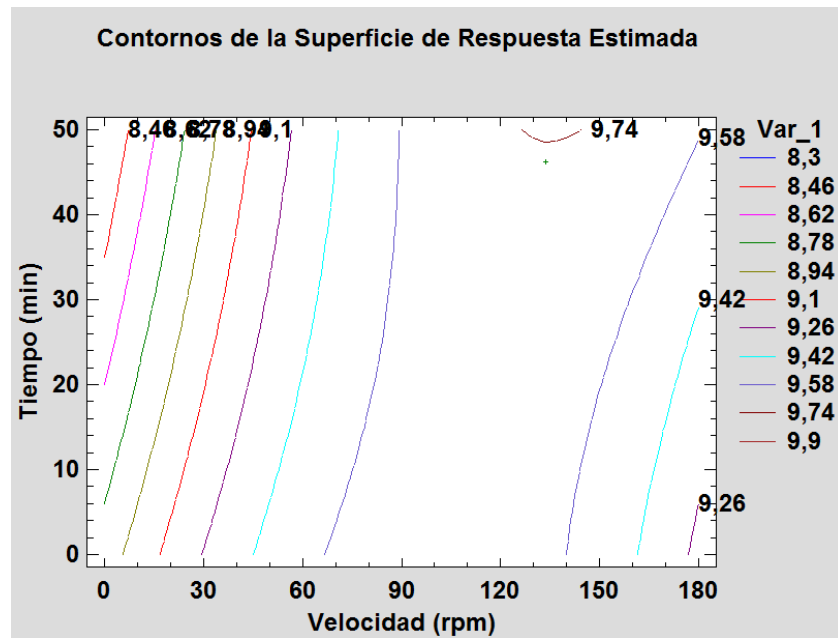


Figura 3. Contorno de superficies de respuesta de la viabilidad promedio

Anexo E: Resultados de la optimización del secador

- Viabilidad promedio (Log(UFC/g))

Análisis de Varianza para viabilidad					
Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
A:Temperatura	0,15981	1	0,15981	2,64	0,2457
B:velocidad	0,266414	1	0,266414	4,40	0,1708
C:Tiempo	0,0140952	1	0,0140952	0,23	0,6771
AA	0,00992853	1	0,00992853	0,16	0,7247
AB	0,0111408	1	0,0111408	0,18	0,7097
AC	0,121661	1	0,121661	2,01	0,2920
Falta de ajuste	0,0939763	6	0,0156627	0,26	0,9165
Error puro	0,121055	2	0,0605276		
Total (corr.)	0,798081	14			

R-cuadrada = 73,0565 por ciento
 R-cuadrada (ajustada por g.l.) = 52,8488 por ciento
 Error estándar del est. = 0,246023
 Error absoluto medio = 0,0843779
 Estadístico Durbin-Watson = 2,81835 (P=0,9333)
 Autocorrelación residual de Lag 1 = -0,475705

Figura 1. Tabla ANOVA de la viabilidad promedio

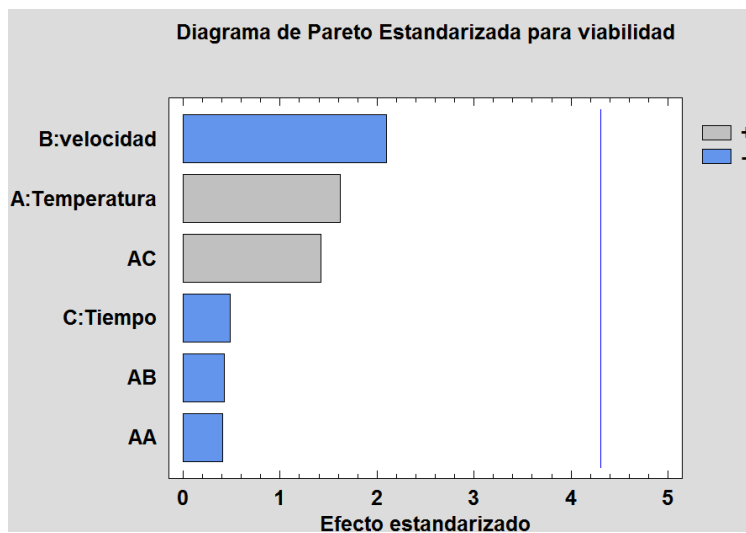


Figura 2. Diagrama de Pareto de la viabilidad promedio

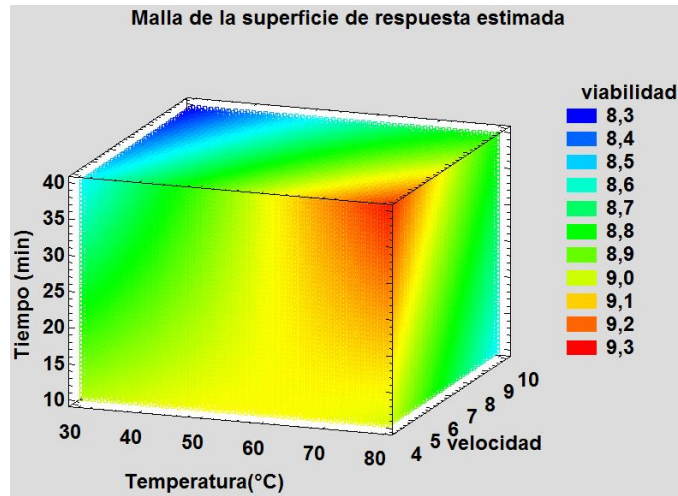


Figura 3. Optimización de la variable viabilidad promedio (gráfica superficie de respuesta)

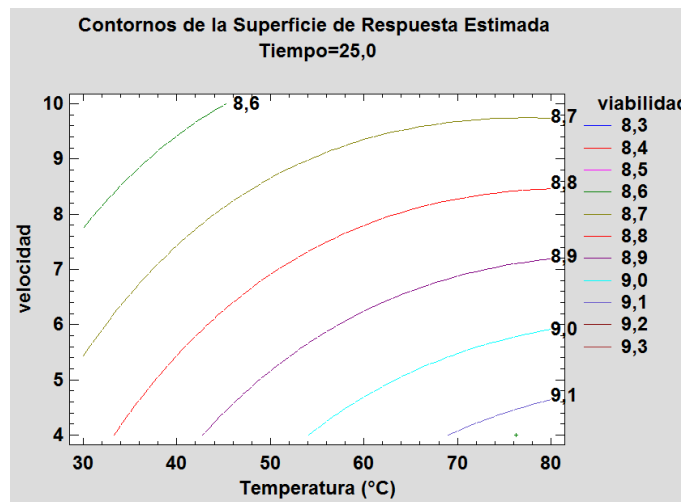


Figura 4. Contorno de la superficie de respuesta estimada para la viabilidad promedio

Optimizar Respuesta

Meta: maximizar viabilidad

Valor óptimo = 9,24135

Factor	Bajo	Alto	Óptimo
Temperatura	30,0	80,0	76,2412
velocidad	4,0	10,0	4,0
Tiempo	10,0	40,0	40,0

Figura 5. Valores óptimos hallados para la viabilidad promedio

- Desviación estándar (Log(UFC/g))

Anexos

Análisis de Varianza para Var_2

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
A:Temperatura	0,0285605	1	0,0285605	1,76	0,3161
B:velocidad	0,0000877813	1	0,0000877813	0,01	0,9481
C:Tiempo	0,00360825	1	0,00360825	0,22	0,6839
AA	0,0115309	1	0,0115309	0,71	0,4882
AB	0,0143161	1	0,0143161	0,88	0,4470
AC	0,000254403	1	0,000254403	0,02	0,9119
BB	0,0000177356	1	0,0000177356	0,00	0,9766
BC	0,00599076	1	0,00599076	0,37	0,6055
CC	0,0000593233	1	0,0000593233	0,00	0,9573
Falta de ajuste	0,0544559	3	0,018152	1,12	0,5044
Error puro	0,0324969	2	0,0162485		
Total (corr.)	0,151458	14			

R-cuadrada = 42,5895 por ciento
 R-cuadrada (ajustada por g.l.) = 0,0 por ciento
 Error estándar del est. = 0,127469
 Error absoluto medio = 0,0671922
 Estadístico Durbin-Watson = 1,41143 (P=0,1256)
 Autocorrelación residual de Lag 1 = 0,130779

Figura 6. Tabla ANOVA para la desvisción estándar

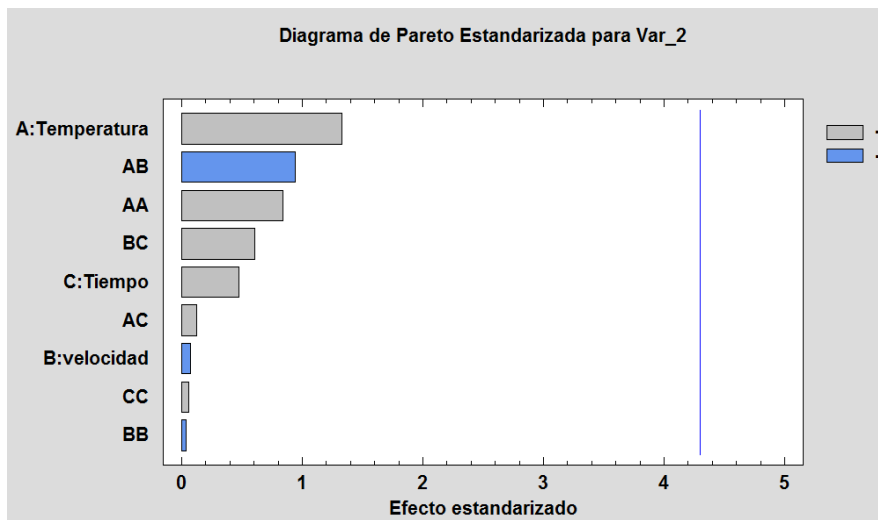


Figura 7. Diagrama de Pareto de la desviación estándar

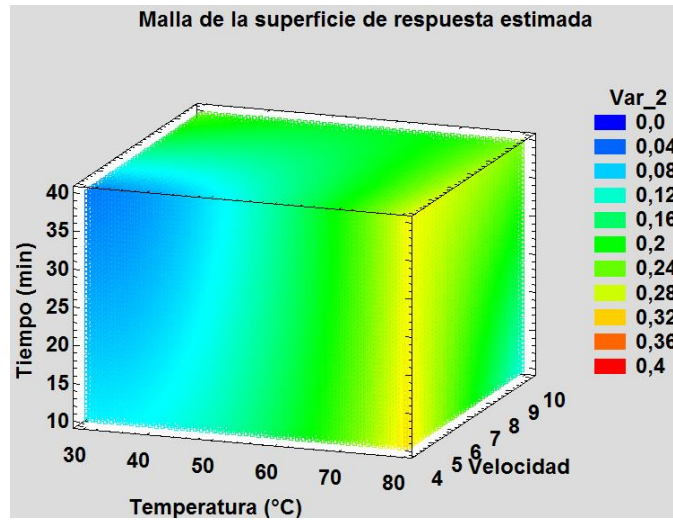


Figura 8. Gráfica de superficie de respuesta para desviación estándar

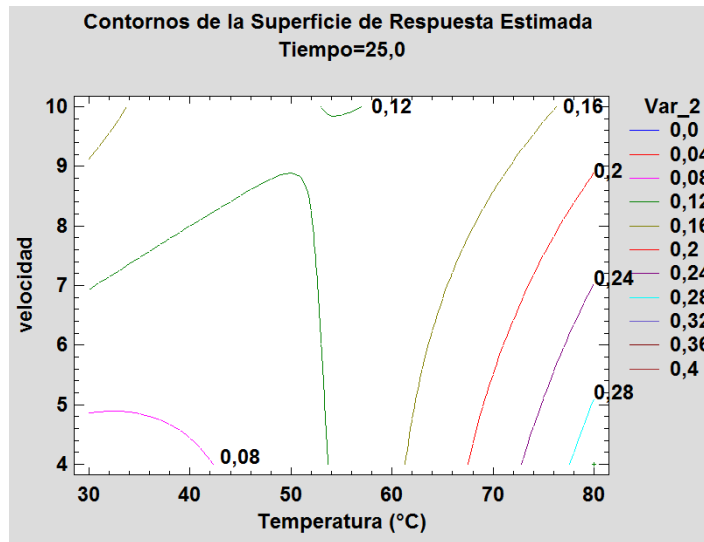


Figura 9. Contornos de superficie de respuesta estimada para la desviación estándar

Optimizar Respuesta
Meta: maximizar Var_2

Valor óptimo = 0,315099

Factor	Bajo	Alto	Óptimo
Temperatura	30,0	80,0	79,9878
velocidad	4,0	10,0	4,0
Tiempo	10,0	40,0	10,0

Figura 10. Valores óptimos hallados para la desviación estándar

Anexos

- **Porcentaje de humedad**

Análisis de Varianza para Var_3

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
A:Temperatura	0,045	1	0,045	0,00	0,9826
B:velocidad	25,92	1	25,92	0,35	0,6149
C:Tiempo	99,405	1	99,405	1,34	0,3672
AB	56,25	1	56,25	0,76	0,4763
AC	84,64	1	84,64	1,14	0,3979
BB	62,3669	1	62,3669	0,84	0,4566
BC	12,25	1	12,25	0,16	0,7242
CC	58,0199	1	58,0199	0,78	0,4704
Falta de ajuste	298,41	4	74,6025	1,00	0,5548
Error puro	148,817	2	74,4085		
Total (corr.)	855,379	14			

R-cuadrada = 47,7159 por ciento
 R-cuadrada (ajustada por g.l.) = 0,0 por ciento
 Error estándar del est. = 8,62604
 Error absoluto medio = 4,14544
 Estadístico Durbin-Watson = 1,73313 (P=0,3312)
 Autocorrelación residual de Lag 1 = 0,0488837

Figura 11. Tabla ANOVA para el porcentaje de humedad

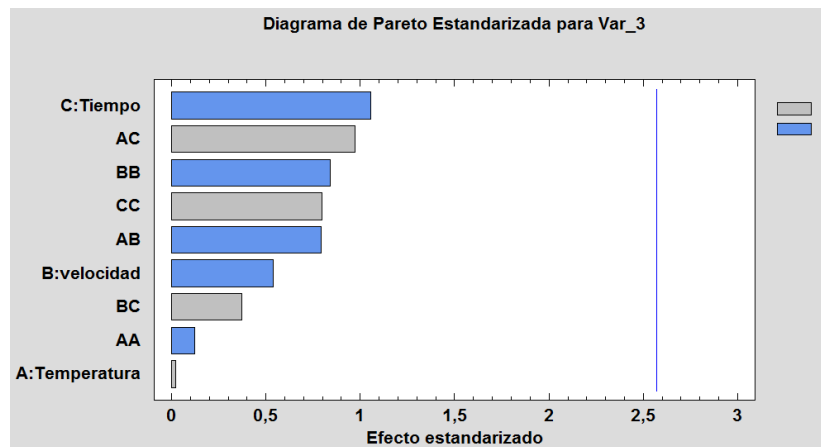


Tabla 12. Diagrama de Pareto para el porcentaje de humedad

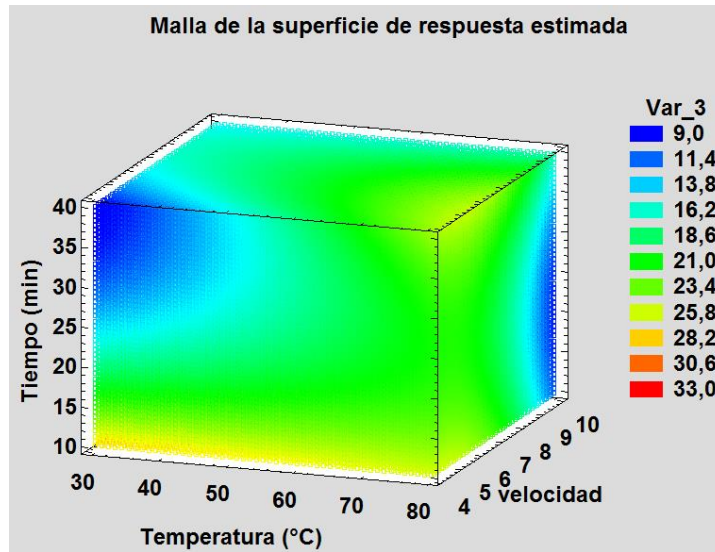


Figura 13. Gráfica de optimización para el porcentaje de humedad

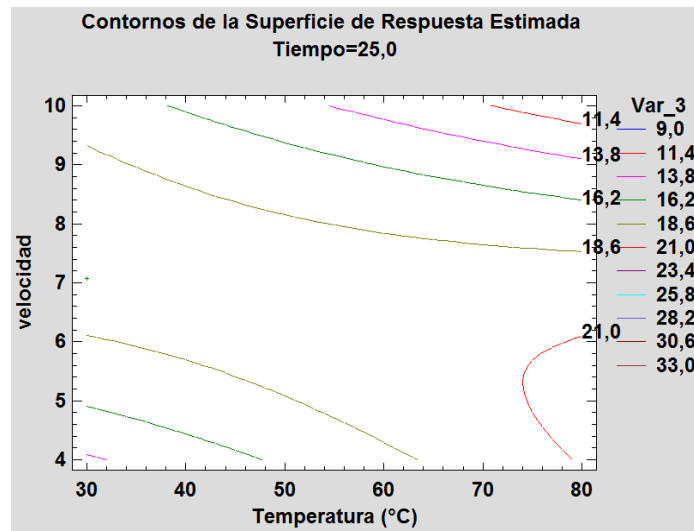


Figura 14. Contornos de superficie de respuesta para el porcentaje de humedad

Optimizar Respuesta
Meta: maximizar Var_3

Valor óptimo = 31,3524

Factor	Bajo	Alto	Óptimo
Temperatura	30,0	80,0	30,0
velocidad	4,0	10,0	7,0708
Tiempo	10,0	40,0	10,0

Figura 15. Valores óptimos del porcentaje de humedad

- Optimización multivariable

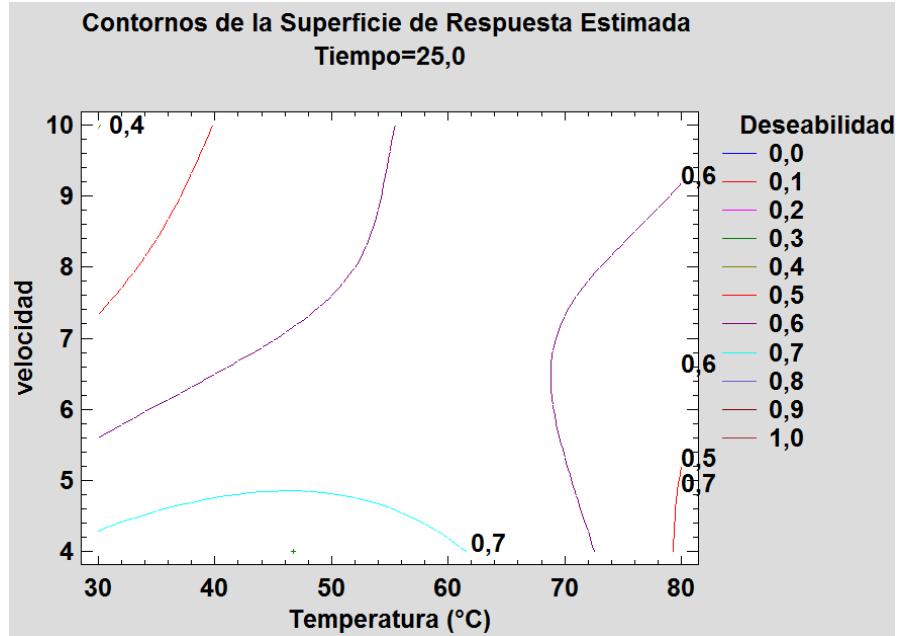


Figura 16. Contornos de superficie de respuesta para la deseabilidad

Optimizar Deseabilidad

Valor óptimo = 0,77747

Factor	Bajo	Alto	Óptimo
Temperatura	30,0	80,0	46,7043
velocidad	4,0	10,0	4,0
Tiempo	10,0	40,0	32,9459

Respuesta	Óptimo
viabilidad	8,88446
Var_2	0,0832018
Var_3	13,5608

Figura 17. Valores óptimos para la deseabilidad

Anexo F: Protocolo del ensayo de humectabilidad para un bioinoculante base pesta con *B. subtilis* EA-CB0575 como ingrediente activo

1. OBJETIVO:

Establecer el método para medir la humectabilidad del bioinoculante base pesta con *Bacillus subtilis* EA-CB0575 como principio activo.

2. DESCRIPCIÓN:

2.1. Principio de la técnica:

Según la Norma Técnica Colombiana (NTC) 439, humectabilidad se define como el tiempo en que tarda la muestra de un producto en humedecerse por completo, teniendo en cuenta las condiciones descritas en la misma (ICONTEC, 1971). Esta propiedad es importante para la solución de diversos problemas, como: la caracterización de la dispersabilidad de un sólido en un líquido, la evaluación de la proporción y el efecto activo de los medicamentos al ser introducidos en el cuerpo, la selección de un líquido aglutinante para la granulación de un sólido, entre otros (Galet, Patry, & Dodds, 2010).

Usualmente, la humectabilidad es determinada mediante el análisis del ángulo de contacto entre el líquido y el sólido, el cual es un indicador de su hidrofobicidad. Así entonces, si las fuerzas adhesivas del sólido-líquido son más fuertes que las fuerzas cohesivas del líquido y las adhesivas del sólido-gas, el proceso de humidificación ocurre (Lazghab & Saleh, 2005).

Anexos

La humectabilidad puede evaluarse mediante procedimientos determinados como: humectación por adhesión, difusión, inmersión y adsorción. Específicamente la humectación por inmersión consiste en sumergir por completo el sólido en el líquido, donde la interfaz sólido-gas es reemplazada en su totalidad por la interfaz sólido-líquido (Lazghab & Saleh, 2005).

Las especificaciones establecidas en este protocolo son tomadas de la primera actualización de la Norma Técnica Colombiana (NTC) 439 denominada “Plaguicidas, coadyuvantes y reguladores fisiológicos. Ensayos de suspensibilidad, humectabilidad y criterios de aceptación”, la cual fue ratificada el 22 de julio de 2015 en Bogotá D.C., Colombia.

2.2. Equipos

Balanza

Cronómetro

2.3. Reactivos

Agua dura

Carbonato de calcio

Óxido de magnesio al 5%

Cloruro de calcio dihidratado

Cloruro de magnesio hexahidratado

2.4. Materiales

Agua destilada

2 recipientes de 250 mL y 6.5 ± 0.5 cm de diámetro interno y 9 ± 0.5 cm de altura.

Bioinoculante (5 ± 0.1 g)

Probeta de 100 mL

Matraz aforado de 100 mL

3. DESARROLLO DE LA TÉCNICA:

3.1. Preparación del reactivo

Solución madre de dureza (dureza total: 34200 ppm de carbonato de calcio)

Esta solución puede prepararse de dos formas, las cuales son:

- Servir en un recipiente (250mL) 2.740 g de carbonato de calcio, 0.276 g de óxido de magnesio y agregar la cantidad mínima de ácido clorhídrico al 5%. El exceso del ácido se remueve poniendo la solución al baño María hasta sequedad, luego el residuo que queda se disuelve con agua destilada y se pone nuevamente al baño María hasta que el agua se evapore por completo. Esto se repite una vez más.
Finalmente, se disuelve el sobrante en agua destilada, pasando esto luego a un matraz de 100 mL aforado y se completa el volumen con agua destilada.
- Asegurándose que la humedad de los reactivos sea la adecuada, adicionar a 100 mL de agua destilada 4.03 g de cloruro de calcio dihidratado y 1.39 g de cloruro de magnesio hexahidratado, formando así una disolución.

Agua dura (dureza equivalente: 342 ppm de carbonato de calcio)

Hacer una dilución con 10 mL de solución madre de dureza y 990 mL de agua destilada

3.2. Procedimiento de la técnica

- Servir 100 ± 1 mL de agua dura a $30 \pm 1^\circ\text{C}$ en el recipiente



Figura 1. Recipiente con agua dura (100 mL)

Anexos

- Pesar $5 \pm 0,1$ g del bioinoculante



Figura 2. Balanza analítica con el bioinoculante

- Agregar la muestra del bioinoculante de forma constante sobre un mismo punto del agua destilada contenida en el recipiente.



Figura 3. Agregando la muestra en el recipiente con agua dura

- Con un cronómetro, contar el tiempo que se demora la muestra en humedecerse, desde el momento en que se agrega ésta sobre el agua hasta que se sumerge por completo en la misma. Así entonces se determina el tiempo de humectabilidad, el cual tiene unidades de segundos.



Figura 4. Uso del cronómetro para tomar el tiempo de humectabilidad en segundos

- Un producto es aceptable si el tiempo de humectabilidad es menor o igual a 1 minuto, con las condiciones evaluadas en este protocolo.

Anexo G: Determinación de pH para la producción de un bioinoculante con base en *B. subtilis* EA-CB0575

1. OBJETIVO:

Establecer la técnica para medir el pH de un bioinoculante con base en *Bacillus subtilis* EA-CB0575.

2. DESCRIPCIÓN

2.1. Principio de la técnica

El pH es un parámetro que permite determinar el nivel de alcalinidad o acidez de una sustancia (Behnood et al., 2015). Por lo general, y según la teoría del químico Danés Brønsted, una sustancia ácida es aquella que puede dar protones, es decir, las partículas de sus átomos que están cargadas positivamente, mientras que las sustancias básicas o alcalinas reciben dichos protones (Fritz & Schenk, 1992).

Los métodos experimentales para medir el pH de una solución pueden clasificarse en dos grupos, los no electroquímicos y los electroquímicos. Dentro de los no electroquímicos están: el método catalítico, basado en el efecto que producen ciertas sustancias en la velocidad de las reacciones químicas (Behnood et al., 2015); el método colorimétrico, mediante el cual se emplean soluciones denominadas indicadores universales, que expresan un color según el pH determinado, o con el uso de papeles indicadores (Vogel, 1961).

Por otra parte, los métodos electroquímicos se basan en la medida de la diferencia de voltaje entre dos electrodos que se encuentran en una solución bajo corriente nula, uno de ellos es el de referencia el cual tiene un potencial constante relacionado al de la solución, mientras que el otro electrodo, que recibe el nombre de selectivo, da la medida (Rouessac & Rouessac, 2004). Dentro de este grupo se pueden mencionar: electrodo de hidrógeno, membranas líquidas y electrodos de vidrio (Behnood et al., 2015).

Anexos

Las especificaciones establecidas en este protocolo son tomadas de la Norma Técnica Colombiana (NTC) 5527 denominada "Fertilizantes. Análisis físicos", la cual fue ratificada el 26 de septiembre de 2007 en Bogotá D.C., Colombia.

2.2. Equipos

Balanza con precisión de 0,01 g
pHmetro electroquímico (electrodos de vidrio)
Plancha de agitación

2.3. Reactivos

Solución reguladora pH 4
Solución reguladora pH 7
Solución reguladora pH 10

2.4. Materiales

Agua destilada
Recipiente de 200 mL
Bioinoculante
Magneto
Termómetro
Probeta

3. DESARROLLO DE LA TÉCNICA

- Elegir dos de las soluciones reguladoras y medirles su pH de forma sucesiva, con el fin de verificar el buen funcionamiento del pHmetro.
- Servir 90 mL de agua destilada en el recipiente.

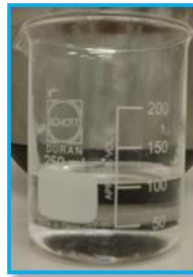


Figura 1. Recipiente con agua destilada

- Pesar 10 g de bioinoculante en la balanza y adicionarlo en el recipiente.



Figura 2. Balanza analítica con el peso del bioinoculante

- Disolver la muestra del producto en el agua mediante el uso de la plancha de agitación y el magneto.



Figura 3. Lado izquierdo está la plancha de agitación con el recipiente y al lado derecho está el magneto para agitar la suspensión

Anexos

- Lavar el electrodo del equipo con agua destilada



Figura 4. Electrodo del pHmetro

- Sumergir el electrodo en la solución del producto, mientras está en agitación, y leer su pH hasta que se estabilice en un valor.



Figura 5. pHmetro usado para el ensayo

- Indicar la temperatura de la solución en el momento de la medida de su pH.

Anexo H: Protocolo del ensayo de suspensibilidad para la producción de un bioinoculante con base en *B. subtilis* EA-CB0575

1. OBJETIVO:

Establecer el método para medir la suspensibilidad del bioinoculante base pesta con *Bacillus subtilis* EA-CB0575 como principio activo.

2. DESCRIPCIÓN

2.1. Principio de la técnica

Una suspensión es un sistema disperso constituido por dos fases, en la primera de ellas es donde se encuentra la sustancia dispersa conocida y la segunda es la fase externa que contiene dicha sustancia. Según el tamaño de la partícula la suspensión se puede clasificar en dos grupos, el primero denominado dispersiones gruesas donde se ubican las partículas con un tamaño mayor a 1 μm , mientras que el otro grupo llamado suspensiones coloidales están las partículas con un tamaño menor a 1 μm (Manoharan & Basarkar, 2010).

Esta propiedad se relaciona fuertemente con la humectabilidad de los sólidos. Al tener una humectabilidad baja los sólidos flotan en la superficie del líquido, causando de esta manera una disminución en la disolución apropiada del producto y a su vez una baja suspensión del mismo en el líquido que lo contiene. Una consecuencia notoria y perjudicial de esta situación es que la dosis del ingrediente

activo no será uniforme por lo que el producto no será eficiente al ser usado. Aunque lo ideal sería que el producto no tuviera ninguna sedimentación durante su almacenamiento y por el contrario, el total de ingrediente activo que contiene debería estar disperso uniformemente, no es posible debido a la inestabilidad termodinámica de las suspensiones (Garad & Wang, 2010).

Anexos

Sin embargo, debido a que esta propiedad es usada en muchas industrias para la fabricación de productos químicos, biológicos y farmacéuticos, se deben cumplir determinados atributos definidos según el producto a comercializar para asegurar la eficiencia de los mismos al momento de ser usados (Ali & Kimura, 2010). En Colombia específicamente, para la producción y comercialización de productos biológicos usados en la agricultura se rigen unas condiciones establecidas por el ICA (Instituto Colombiano Agropecuario) mediante la resolución 698, donde se establece que estos productos deben cumplir con unos estándares en ciertas propiedades fisicoquímicas, entre las cuales se encuentra la suspensibilidad (ICA, 2011).

Según la Norma Técnica Colombiana 134 la suspensibilidad se define como: “cantidad de uno o más ingredientes activos suspendidos después de un tiempo dado en una columna de líquido con una altura determinada”. Para el análisis de ésta en un determinado producto biológico se debe seguir el procedimiento estipulado en la primera actualización de la Norma Técnica Colombiana (NTC) 439, expedida el 22 de julio de 2015 en Bogotá D.C.

2.2. Equipos

Balanza

Cronómetro

Baño María

Centrífuga

Horno

2.3. Reactivos

Agua dura

Carbonato de calcio

Óxido de magnesio

Ácido clorhídrico 5%

Cloruro de calcio dihidratado

Cloruro de magnesio hexahidratado

2.4. Materiales

Probeta de 250 mL con tapa esmerilada

Tubo de 50 mL

Pipeta volumétrica

Matraz aforado

Vidrio reloj

Bioinoculante

3. DESARROLLO DE LA TÉCNICA

3.1. Preparación del reactivo principal

Solución madre de dureza (dureza total: 34200 ppm de carbonato de calcio)

Esta solución puede prepararse de dos formas, las cuales son:

- Servir en un recipiente (250mL) 2.740 g de carbonato de calcio, 0.276 g de óxido de magnesio y agregar la cantidad mínima de ácido clorhídrico al 5%. Seguido a esto, se remueve el exceso de ácido poniendo la solución en el baño María hasta sequedad y se disuelve el residuo que queda con agua destilada. Esta nueva solución se pone al baño María hasta que el agua se evapore por completo y se repite los dos últimos pasos una vez más. Finalmente, se disuelve el sobrante en agua destilada, pasando esto luego a un matraz de 100 mL aforado y se completa el volumen con agua destilada.
- Asegurándose que la humedad de los reactivos sea la adecuada, adicionar a 100 mL de agua destilada 4.03 g de cloruro de calcio dihidratado y 1.39 g de cloruro de magnesio hexahidratado, formando así la solución madre de dureza.

Agua dura (dureza equivalente: 342 ppm de carbonato de calcio)

- Hacer una dilución con 10 mL de solución madre de dureza y 990 mL de agua destilada



Figura 1. Lado izquierdo es la solución madre de dureza y al lado derecho el agua dura

3.2. Procedimiento de la técnica

- Pesar la cantidad de bioformulado suficiente para preparar 250 mL de suspensión con la misma concentración especificada del producto.
- Si las indicaciones del producto establecen que éste no se puede adicionar directamente al tanque de aspersion en el momento de su uso, seguir el método A, de lo contrario realizar el método B, como se describen a continuación:

Método A

Poner en un recipiente la muestra pesada anteriormente y adicionarle 5 mL de agua dura, mezclar esto con una varilla de vidrio por 2 minutos hasta conseguir una consistencia suave. Mientras se sigue agitando, adicionar 50 mL de agua dura a 30°C y luego dejar reposar por 13 minutos en el baño María a esa misma temperatura. Finalmente, llevar la solución a la probeta de 250 mL usando más agua dura, la cual debe estar a 30°C.

Método B

Adicionar la muestra el bioinoculante en un recipiente con 50 mL de agua dura a 30°C, revolver manualmente por dos minutos a razón de 120 veces por minuto aproximadamente. Dejar la suspensión en reposo por 4 minutos en el baño María a 30°C. Cumplido ese tiempo, pasar la suspensión a la probeta de 250 mL, previamente pesada, adicionándole más agua dura a la misma temperatura.



Figura 2. Suspensión preparada por el Método B

- Completar la probeta de 250 mL con agua dura a 30 °C y ponerle la tapa esmerilada.
- Invertir la probeta manualmente 180°, 30 veces
- Poner la probeta en el baño María de forma vertical por 30 min a 30°C. Procurar que la zona donde se ubique esté libre de vibraciones y de luz solar.

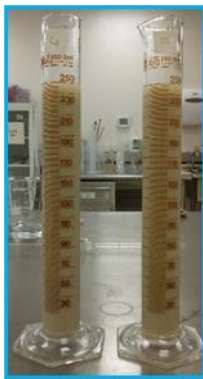


Figura 3. Suspensiones después de los 30 minutos en el baño maría

- Con la pipeta volumétrica, succionar delicadamente los 225 mL superiores de la suspensión en un rango de 10 a 15 segundos.
- Los 25 mL de suspensión restantes se llevan al horno a 70°C hasta sequedad.



Figura 4. Sedimento obtenido después de ser secada la suspensión

- Se pesa el sedimento seco contenido en la probeta y a ese valor se le resta el peso de la probeta sola (medido anteriormente).
- Con los datos recopilados, se calcula el porcentaje de suspensibilidad con la siguiente fórmula:

$$\% \text{ suspensibilidad} = \frac{10}{9} * \frac{100(c - Q)}{c} = \frac{111(c - Q)}{c}$$

Dónde:

c: masa del ingrediente activo en la probeta completa $\left(\frac{a+b}{100}\right)$

a: Porcentaje en masa del ingrediente activo en la muestra

b: masa de la muestra adicionada a la probeta (g)

Q: masa del ingrediente activo de los 25 mL restantes en la probeta (g)

- El porcentaje de suspensibilidad debe estar entre 60 % y 105% para ser aceptado.

BIBLIOGRAFÍA

- Alava, J. M., & Millar, S. J. (2001). The Determination of Wheat Breadmaking Performance and Bread Dough Mixing Time by NIR Spectroscopy for High Speed Mixers. *Journal of cereal science*, 81.
- Ali, Y., & Kimura, A. (2010). Pharmaceutical development of suspension dosage form *Pharmaceutical suspensions. From formulation development to manufacturing* (pp. 104-126). Bogotá D.C, Colombia.
- Altuhaish, A. (2014). Biofertilizer effects in combination with different drying system and storage period on growth and production of tomato plant under field conditions. *Emirates Journal of food and agriculture*, 716-722.
- Araujo, F. (2008a). Inoculacao de sementes com *Bacillus subtilis*, formulado com farinha de ostras e desenvolvimento de milho, soja e algodao. *Ciencia, agrotecnologia*, 456.
- Araujo, F. (2008b). INOCULAÇÃO DE SEMENTES COM *Bacillus subtilis*, FORMULADO COM FARINHA DE OSTRAS E DESENVOLVIMENTO DE MILHO, SOJA E ALGODÃO.
- Arbari, H; Karimi, Keirhosro. Optimization of baker's yeast drying in industrial continuous fluidized bed dryer. *Food and Bioproducts processing*. 2012.
- Baquero, I., & Tobar, M. (2007). *Bioinsumos. Informe de vigilancia tecnológica*. Bogotá, Colombia: Colciencias.
- Bashan, Y. (1998). Inoculants of plant growth-promoting bacteria for use in agriculture. *Biotechnology advances*, 16, 729-770.

-
- Bashan, Y., & Bashan, L. (2013). Advances in plant growth-promoting bacterial inoculant technology: formulations and practical perspectives (1998–2013). *Plant Soil*, 2-24.
- Bayer, c. (2007). Kodiak® Concentrate Biological Fungicide (pp. 1-4). Estados Unidos.
- Beauregard, P. B., Chai, Y., & Vlamakis, H. (2013). *Bacillus subtilis* biofilm induction by plant polysaccharides. *PNAS Plus*, 1-10.
- Behnood, A., Tittelboom, K. V., & De Belie, N. (2015). Methods for measuring pH in concrete: A review. *Construction and Building Materials*, 176-188.
- Bravo, A., & Ceron, J. (2004). *Bacillus thuringiensis en el control biológico*. Bogotá, Colombia: Universidad Nacional de Colombia.
- Bukovec, P., & Turk, S. (2009). Optimization of melt pelletization in a high shear mixer. *International Journal of Pharmaceutics*, 198.
- Burges, H. D. (1998). *Formulation of microbial biopesticides: Beneficial microorganisms, nematodes and seed treatments*. The Netherlands.
- Cartman, S. T., & La Ragione, R. M. (2004). Spore probiotics as animal feed supplements *Bacterial spore formers: probiotics and emerging applications* (pp. 155-159). Inglaterra.
- Cazacliu, B., & Legrand, J. (2008). Characterization of the granular to fluid state process during mixing by power evolution in a planetary concrete mixer. *Chemical Engineering Science*, 4630.
- Celis, L., & Gallardo, I. (2008). *Estandarización de métodos de detección para promotores de crecimiento vegetal (ácido indol acético y giberelinas)*. (Microbiología agrícola y veterinaria), Pontificia Universidad Javeriana, Bogotá, Colombia.
- Chen, F., & Guo, S. (2014). Preparation of Wetting Powder for Biocontrol *Bacillus Subtilis* *Proceedings of the 2012 International Conference on Applied Biotechnology (ICAB 2012)*. Berlin.
- Clark, P. (2009). *Case Studies in food engineering. Learning for experience*. Estados Unidos.
- Cleary, P., & Sinnott, M. (2008). Assessing mixing characteristics of particle-mixing and granulation devices. *Particuology*, 419 - 444.
- Connick, W. J., Nikle, W. R., & Vinyard, B. T. (1993). "Pesta": New granular formulations for *Steinernema carpocapsae*. *Journal of Nematology*, 203.

Bibliografía

- Coulson, J., & Richardson, J. (1981). *Ingeniería química: operaciones básicas* (R. S.A. Ed.). España.
- Cuéllar, T. Z. (2014). *Evaluación de la promoción de crecimiento de Bacillus subtilis EA-CB0575 en cultivos de banano, crisantemo y café*. (Maestría en Ingeniería), Universidad EAFIT, Medellín, Colombia.
- Dhenge, R., & Fyles, R. (2010). Twin screw wet granulation: Granule properties. *Chemical Engineering Journal*, 322 - 329.
- Edgar, T. F., & Himmelblau, D. M. (1988). *Optimization of chemical processes*. Estados Unidos.
- Emmert, E., & Handelsman, J. (1999). Biocontrol of plant disease: a (Gram-) positive perspective. *FEMS, Microbiology letters*, 1-9.
- Forny, L., & Marabi, A. (2011). Wetting, disintegration and dissolution of agglomerated water soluble powders. *Powder Technology*, 72-78.
- Fravel, D. R., Connick Jr, W. J., & Lewis, J. A. (1998). Formulation of microorganisms to control plant diseases *Formulation of microbial biopesticides* (pp. 187-199). The Netherlands.
- Fritz, J., & Schenk, G. (1992). *Química analítica cuantitativa* (G. N. Editores Ed.). México.
- Galet, L., Patry, S., & Dodds, J. (2010). Determination of the wettability of powders by the Washburn capillary rise method with bed preparation by a centrifugal packing technique. *Journal of Colloid and Interface Science*, 470-475.
- Garad, S., & Wang, J. (2010). Preclinical development for suspensions *Pharmaceutical suspensions. From formulation development to manufacturing* (pp. 127-175). Estados Unidos.
- Geankopolis, C. J. (1998). *Procesos de transporte y operaciones unitarias*. Mexico.
- Gutiérrez, H. P., & De la vara, R. S. (2008). *Análisis y diseño de experimentos*. México.
- Gutiérrez, J. (2014). *Mejoramiento de un producto bioestimulante con base en Bacillus subtilis EA-CB0575 para la promoción de crecimiento en banano*. Retrieved from Medellín, Colombia:
- Hegedús, Á., & Pintye-Hódi, K. (2007). Influence of the type of the high-shear granulator on the physico-chemical properties of granules. *Chemical Engineering and processing*, 1019.
- Herrmann, L. (2013). Challenges of formulation and quality of biofertilizers for successful inoculation. *Appl. Microbiology Biotechnology*, 8860.

-
- ICA. (2011). *Requisitos para el registro de departamentos técnicos de ensayos de eficiencia, productores e importadores de bioinsumos de uso agrícola y se dictan otras disposiciones*. Bogotá, Colombia.
- Plaguicidas: Ensayos de suspensibilidad y humectabilidad en polvos mojables, NTC 439 C.F.R. (1971).
- Industrias alimentarias. Harina de trigo. Métodos de ensayo, NTC 282 C.F.R. (1986).
- Agentes biológicos para el control de plagas. Agentes microbianos a base de hongos y bacterias. Parte 1. Producción., NTC 4422-1 C.F.R. (1998).
- Plaguicidas agrícolas. Definiciones y clasificación, NTC 134 C.F.R. (2006).
- Fertilizantes. Análisis físicos, NTC 5527 C.F.R. (2007).
- Bioinsumos para uso agrícola. Inoculantes biológicos, NTC 5842 C.F.R. (2011).
- Bioinsumos para uso agrícola. Agentes biológicos para el control de plagas y enfermedades. Parte 1: Producción, NTC 4422-1 C.F.R. (2012).
- Plaguicidas, coadyuvantes y reguladores fisiológicos. Ensayos de suspensibilidad, humectabilidad y criterios de aceptación, NTC 439, Primera actualización C.F.R. (2015).
- Jin, X., & Grigas, K. (1998). United States Patent No.5733774.
- Juárez, V. (2004). Genética y biología molecular de *Bacillus thuringiensis* *Bacillus thuringiensis en el control biológico* (pp. 27-34). Bogotá, Colombia.
- Kadam, K. (1990). *Granulation technology for bioproducts* (C. Press Ed.). Estados Unidos.
- Kilian, M., Steiner, U., & Krebs, B. (2000). FZB24® *Bacillus subtilis* – mode of action of a microbial agent enhancing plant vitality. *Pflanzenschutz-Nachrichten Bayer*, 72-93.
- Layton, C., Maldonado, E., & Monroy, L. (2011). *Bacillus* spp.; perspectiva de su efecto biocontrolador mediante antibiosis en cultivos afectados por fitopatógenos. *NOVA - Publicación científica en ciencias biomédicas*, 9, 177 - 187.
- Lazghab, M., & Saleh, K. (2005). Wettability assessment of finely divided solids. *Powder technology*, 79-91.
- Liu, Y., & Pan, X. (2014). A 1961–2010 record of fertilizer use, pesticide application and cereal yields: a review. *Agronomy sustainable development*, 83-93.
- Lyuri, D. (2008). Agriculture. *Global Ecology*, 76-84.
- Manoharan, C., & Basarkar, A. (2010). Various pharmaceutical disperse systems *Pharmaceutical suspensions. From formulation development to manufacturing* (pp. 1-38). Estados Unidos.

Bibliografía

- Naidu, M., & Vadashree, M. (2015). Effect of drying methods on the quality characteristics of dill (*Anethum graveolens*) greens. *Food chemistry*, 849 - 850.
- Niu, S.-Q., Paré, P. W., & Aziz, M. (2015). Induced growth promotion and higher salt tolerance in the halophyte grass *Puccinellia tenuiflora* by beneficial rhizobacteria. *Plant soil*.
- Novozymes. (2011). Soil Implant +: granular inoculant for. In Novozymes (Ed.). Estados Unidos.
- Oostveen, M., & Meesters, G. (2015). Quantification of powder wetting by drop penetration time. *Powder Technology*, 62-66.
- Ortega, E. (2012). *Non-thermal food engineering operations*. México: Springer.
- O'Connor, R. E. (1990). Extrusion and spheronization *Granulation technology for bioproducts* (pp. 102-110). Estados Unidos.
- Paau, A. S. (1998). Formulation of beneficial organisms applied to soil *Formulation of microbial biopesticides* (pp. 250, 251). The Netherlands.
- Posada, L. F. (2012). *Diseño conceptual del proceso productivo de la cepa Bacillus subtilis EA-CB0575 para la promoción de crecimiento de Musa AAA*. (Magister ciencias-biotecnología), Universidad Nacional de Colombia, Medellín, Colombia.
- Posada, L. F., Romero, M., & Villegas, V. (2015). Effect of medium components and culture conditions in *Bacillus subtilis* EA-CB0575 spore production. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 1879-1888.
- Rahmanian, N., Gahdiri, M., & Ding, Y. (2008). Effect of scale of operation on granule strength in high shear granulators. *Chemical Engineering Science*, 923.
- Ramírez, M. (2012). *Bacterias asociadas a raíces de Musa spp.: Densidad poblacional y potencial promotor de crecimiento vegetal*. (Posgrado en Biología), Universidad de Antioquia, Medellín.
- Rouessac, F., & Rouessac, A. (2004). *Chemical analysis: modern instrumentation, methods and techniques*.
- Roy, R. N., Finck, A., & Blair, G. J. (2006). *Plant nutrition for food security. A guide for integrated nutrient management*. Roma, Italia: FAO.
- Saleh, M., & Dhenge, R. (2015). Twin screw wet granulation: Binder delivery. *International Journal of pharmaceutics*, 487, 124 - 134.
- Sánchez, F. (1998). Características de los formulados comerciales de plaguicidas. Influencia sobre los residuos encontrados en alimentos. 125-140.

-
- Sarkar, A., & Wassgren, C. (2009). Simulation of a continuous granular mixer: Effect of operating conditions on flow and mixing. *Chemical Engineering Science*, 2682.
- Schwartz, J. B. (1990). Theory of granulation *Granulation technology for bioproducts* (pp. 10-28). Estados Unidos.
- Senesi, S. (2004). *Bacillus* spores as probiotic products for human use *Bacterial spore formes: probiotics and emerging applications* (pp. 133-136). Inglaterra.
- Shabana, Y., D, M.-S., & Sauerborn, J. (2003). Granular Pesta formulation of *Fusarium oxysporum* f. sp. *orthoceras* for biological control of sunflower broomrape: efficacy and shelf-life. *Biological Control*, 189–201.
- Sharma, S., Mulvaney, S., & Rizvi, S. (2000). *Food process engineering. Theory and laboratory experiments* (W.-. Interscience Ed.). Nueva York, Estados Unidos.
- Shenoy, p., & Innings, F. (2015). Dry mixing of food powders: Effect of water content and composition on mixture quality of binary mixtures. *Journal of food engineering*, 149, 229-236.
- Slettengren, K., & Heunemann, P. (2015). Production and evaluation of water based powder-liquids and powder-liquid mixing. *Journal of food engineering*, 169, 278-283.
- Stephens, J., & Rask, H. (2000). Inoculant production and formulation. *Fields Crops Research*, 249-258.
- Tabandeh, F., & Yakhchali, B. (2008). Response surface optimization of medium composition for alkaline protease production by *Bacillus clausii*. *Biochemical engineering journal*, 37-42.
- Tang, W.-H., Mei, R.-H., & Zhang, S.-A. (1996). Increased growth and yield of rice by treating seeds and spraying plants with non-nitrogen-fixing bacteria. *Biological nitrogen fixation associated with rice production*, 70, 231-242.
- Tasirin, S. M., & Kamarudin, S. K. (2007). Optimization of drying parameters of bird's eye chilli in a fluidized bed dryer. *Journal of food Engineering*, 700.
- Timko, R., Cliff, M., & Rosenberg, H. (1990). High-intensity mixer granulators *Granulation technology for bioproducts* (pp. 120 - 162). Estados Unidos.
- Toro, D., & Garcés, K. (2009). *Promoción de crecimiento vegetal en plantas de ciclo corto por rizobacterias formadoras de endoesporas*. Universidad EAFIT, Medellín, Colombia.

Bibliografía

- Urdaci, M. C., & Pinchuk, I. (2004). Antimicrobial activity of *Bacillus* probiotics *Bacterial spore formers: probiotics and emerging applications* (pp. 171-175).
- Vessey, K. (2003). Plant growth promoting rhizobacteria as biofertilizers. *Plant and soil*, 571-586.
- Vogel, A. I. (1961). *Química analítica cuantitativa: química analítica aplicada, análisis instrumental y análisis de gases* (Kapelusz Ed. Vol. II). Argentina.
- Waites, W. M., & Kay, D. (1970). Sporulation in *Bacillus subtilis*. *Biochemistry journal*, 676.
- Wilson, A. J., & Morgenstern, M. P. (2001). Mixing response of a variable speed 125 g laboratory scale mechanical dough development mixer. *Journal of cereal science*, 158.
- Wilson, D., & Rough, S. (2007). Extrusion-Spheronisation *Granulation* (pp. 189 - 199). Cambridge, U.K.
- Yang, J., Wang, W., & Yang, P. (2015). Isolation and identification of *Serratia marcescens* Ha1 and herbicidal activity of Ha1 'pesta' granular formulation. *Journal of Integrative Agriculture*, 1348–1355.
- Yara. (2012). *The Yara guide to mineral fertilizers: A basic handbook on fertilizers and their use*. U.K.
- Yáñez-Mendizabal, V., & Viñas, I. (2012). Endospore production allows using spray-drying as a possible formulation system of the biocontrol agent *Bacillus subtilis* CPA-8. 735.
- Zahran, E., Sauerbon, J., & Abbasher, A. A. (2008). "Pesta" and alginate delivery systems of *Fusarium* spp. for biological control of *Striga hermonthica* (Del.) Benth. under Sudanese field conditions. *Biological Control*, 160–168.
- Zounis, S., & Quail, K. J. (1997). Predicting test bakery requirements from laboratory mixing tests. *Journal of cereal science*, 196.