

Desarrollo de un bioinsumo agrícola con base en un consorcio de *Bacillus subtilis*- *Pseudomonas sp.*

Ana María Higueta Ramírez^a, Ana María Restrepo Rivillas^a

Luisa F. Posada^b

^a Estudiante de Ingeniería de Procesos, Universidad EAFIT, Medellín Colombia

^b Profesor, Asesor del Proyecto de Grado, Departamento de Ingeniería de Procesos, Departamento de Ciencias Biológicas, Universidad EAFIT, Medellín, Colombia

Resumen

Para aumentar la producción anual y el crecimiento vegetal de los cultivos se emplean agroquímicos. Sin embargo, su uso excesivo genera daños importantes a nivel ambiental, social y económico, debido a su alto costo y a su composición química. Los bioinsumos, cuyo principio activo son las bacterias promotoras del crecimiento, PGPR (Plant Growth Promoting Rhizobacteria), son una solución segura y sostenible para estimular el crecimiento vegetal. Estos bioinsumos emplean una cepa o consorcios bacterianos, buscando resultados favorables para el crecimiento vegetal. Este proyecto busca evaluar un consorcio microbiano, con una cepa *Bacillus subtilis* y otra *Pseudomonas.sp.*, que promueva el crecimiento vegetal en cultivos de interés económico del país. Para ello se evaluó el potencial de promoción de crecimiento de ambas cepas a partir de pruebas microbiológicas y bioquímicas (antagonismo *in vitro*, producción de índoles totales y lipopéptidos, solubilización de fosfatos y fijación de nitrógeno), se evaluaron las cepas en plantas de frijol cargamanto rojo y banano cv. Williams a nivel de invernadero, contrastando con un control sin aplicación de microorganismos y con un control positivo de fertilización convencional; a través de las variables de respuesta número de hojas, longitud aérea, diámetro del tallo. Adicionalmente se realizó una evaluación técnico-económica para la producción del bioinsumo. Las pruebas bioquímicas indicaron una producción de lipopéptidos e índoles totales, se confirmó su potencial para fijación Nitrógeno y solubilización fosfato. A nivel de invernadero se encontró que las plantas de banano con fertilizante comercial reportaban una tasa de crecimiento mayor en algunas variables, pero un rendimiento similar a los tratamientos con bacterias. Para el cultivo de frijol se obtuvo un rendimiento similar en cuanto a longitud aérea y número de hojas, sin embargo, el diámetro, el área foliar y el % germinación fue menor para el fertilizante comercial. De la evaluación técnico-económica del proceso se encontró que es viable debido a un VPN de \$ 18.507.781.650, un B/C de 4.1 y una TIR de 62.42% siendo esta mayor a la tasa de oportunidad empleada que es del 4.48%.

Introducción

Colombia es un país productor de banano y frijol, cultivos de importancia en la economía del país no sólo por ser parte de la canasta familiar, sino también por su potencial de exportación, específicamente en el caso del banano. La producción de frijol y banano en el país es cercana a las 115.609 Ton y 6.277.110 Ton respectivamente [1], sin embargo, esta cantidad de frijol no satisface la demanda interna del país, por lo que es necesario importar aproximadamente 291.489 Ton anuales de este cultivo [2]. Por otro lado, el banano está consolidado en el mercado internacional, con exportaciones de alrededor de 101.4 millones de cajas en el año 2018, equivalente a una ganancia de aproximadamente 811 millones de dólares [3].

La demanda de estos cultivos ha generado una aplicación extensiva de agroquímicos con el fin de aumentar el rendimiento de la producción y tener control sobre los patógenos y plagas que afectan a cada cultivo. Si

bien estos agroquímicos proporcionan una mayor disponibilidad de nutrientes para el desarrollo y crecimiento de la planta, su uso excesivo genera efectos adversos para el medio ambiente, la salud de los animales y personas expuestas a estas sustancias. En cuanto al aspecto ambiental, se genera una alteración en los ciclos biogeoquímicos, lo cual implica una contaminación en las fuentes hídricas debido a la cantidad de carga química que contienen, generando eutrofización y comprometiendo la salud de las comunidades aledañas a los cultivos; puesto que algunos de estos compuestos son tóxicos y pueden generar efectos adversos a largo plazo a aquellas personas que los consuman [4]. Adicionalmente, se genera una saturación en el suelo y la capacidad de absorción de nutrientes se ve disminuida [5]. Debido a esto, se buscan otras alternativas las cuales logren contrarrestar el daño ambiental y social ocasionado por el uso de estos productos.

La aplicación de bioinsumos agrícolas es una de las alternativas para la producción de cultivos con un menor impacto. Algunos de estos bioinsumos tienen el potencial de reducir el uso de agroquímicos, ayudando a una agricultura con mayor sostenibilidad. Los biofertilizantes y bioestimulantes, específicamente, promueven y mejoran el crecimiento vegetal de los cultivos, contribuyendo al cuidado del suelo y/o a la captación de nutrientes [6]. Dentro de los biofertilizantes y bioestimulantes se encuentran aquellos cuyo principio activo son bacterias promotoras de crecimiento, conocidas como PGPB (Plant Growth Promoting Bacteria) o específicamente PGPR (Plant Growth Promoting Rhizobacteria), las cuales habitan en la rizósfera de la planta y cuentan con la capacidad de incrementar y estimular el crecimiento de la planta, mejorar su productividad y/o pueden controlar fitopatógenos. Dentro de estas bacterias, se encuentran muchas cepas correspondientes a diferentes géneros bacterianos como *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Azospirillum*, *Rhizobium*, entre otros [7]. Estos microorganismos cuentan con diferentes mecanismos de acción que se agrupan en mecanismos directos o indirectos. Al primer grupo corresponden la producción de hormonas, la producción de sideróforos, la fijación de nitrógeno, la solubilización de fosfatos, entre otros, que mejoran la nutrición y crecimiento vegetal; mientras que en el segundo se encuentran la capacidad de antibiosis, la resistencia sistémica inducida y la competencia por nicho, mecanismos que ayudan a mantener la sanidad de las plantas.

En Colombia hasta el mes de agosto del 2019, se encontraron 195 registros de empresas para producción o comercialización de bioinsumos, de las cuales el 50,26% corresponde a empresas productoras y el 48,72% a empresas importadoras [8]. Asimismo, hasta la misma fecha se hallaron registros de 308 productos reportados como bioinsumos [9]. Actualmente en el desarrollo de bioinsumos, es más frecuente el uso de las cepas pertenecientes al género *Bacillus*, para el control biológico o promoción de crecimiento vegetal de varios cultivos, entre los cuales se encuentran el café, soya, manzana, alfalfa, aguacate, hierbas de pastos y arroz. Esto se debe a que estos microorganismos poseen un alto potencial industrial para el desarrollo de bioplaguicidas o biofertilizantes [10], ya que cuentan con la capacidad para la formación de esporas de resistencia, que soportan la desecación y el calor, por lo que los formulados biológicos tienen mayor viabilidad [11].

Dentro de los múltiples reportes de bioinsumos con base en *Bacillus* se encuentran los de cepas y procesos realizados en el grupo de investigación CIBIOP de la Universidad EAFIT, donde los mejores resultados se han logrado usando la cepa *Bacillus subtilis* EA-CB0575 para la promoción de crecimiento vegetal en el cultivo del banano [12], además en cultivos de crisantemo, café [13] y tomate [14]. Del mismo modo, se hallaron estudios de los efectos que tienen algunos PGPR en específico sobre el cultivo del tomate, entre ellos se reportan cepas de las especies *Bacillus amyloliquefaciens*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus cereus*, *Pseudomonas putida*, *Pseudomonas fluorescens*, y *Serratia marcescens* [15]. En este cultivo se encuentra información acerca de la mejora del rendimiento en la planta empleando una co-inoculación o un consorcio de *Bacillus spp.* y *Pseudomonas putida*, en comparación de cualquier otro tratamiento [16]. En otros cultivos como la alfalfa, se reporta el uso de la *Pseudomonas fluorescens* C119 para el desarrollo de un biofertilizante y biopesticida, obteniendo una mejora del 40% en el crecimiento vegetal sin tener incidencia sobre la comunidad microbiana de la rizósfera de la planta [17]. Por otra parte, se ha encontrado información de la inoculación con cepas de *Rhizobium*, *Azospirillum* y *Azotobacter* e inoculaciones combinadas o consorcios entre estas bacterias para el cultivo del frijol, obteniendo una mejora en el número de raíces laterales formadas [18], además de la inoculación con cepas del género *Ramlibacter* sp, mejorando la formación de nódulos en las raíces del frijol para fijar nitrógeno al igual que el género *Rhizobium* [19]. De igual modo, algunas cepas de *Bacillus* y *Pseudomonas* cuentan con buenos resultados como promotoras de crecimiento vegetal en este cultivo [20].

Este proyecto tiene como fin obtener un bioinsumo a partir de un consorcio microbiano con una cepa de *Bacillus subtilis* y una cepa de *Pseudomonas* sp ambos con potencial para la promoción de crecimiento vegetal. Se busca entonces que este producto estimule e incremente el crecimiento vegetal para los cultivos de interés seleccionados. Además, se evalúa la viabilidad técnica y económica de la producción de bioinsumo en Colombia.

Materiales y métodos

Microorganismos empleados: Los microorganismos empleados corresponden a las cepas B33 y C41 del cepario previamente aislado a nivel de invernadero de plantas de banano variedad Calcutta 4 y Williams respectivamente (códigos Sibb EA-ED0676 y EA-ED0825). Ambas cepas fueron purificadas y conservadas a -80°C en TSB con glicerol en el laboratorio de Bioprocesos de la Universidad EAFIT, Medellín. Ambas cepas fueron identificadas por medio de la secuenciación del gen 16S rRNA y sus secuencias se ingresaron al Gen Bank, obteniendo como resultados los números de acceso MN598217 y MN598216, respectivamente.

Para los diferentes ensayos realizados se realizó una activación previa del microorganismo en el laboratorio de bioprocesos de la universidad EAFIT, usando un medio sólido enriquecido (TSA 50, compuesto por 20 g/L y 9g/L batchoagar) e incubando por 24 h a 30°C .

Evaluación a nivel in vitro del potencial promotor de crecimiento de los microorganismos empleados en el consorcio microbiano

Evaluación del antagonismo microbiano entre las cepas de estudio: Con el fin de generar un consorcio bacteriano con las cepas *B. subtilis* B33 y *Pseudomonas putida* C41, se procedió a evaluar el efecto antagónico en el crecimiento de una cepa sobre la otra, empleando el método de platos duales. Para ello, se resuspendieron colonias de las cepas de estudio en ADE y se ajustó la densidad óptica a 600 nm (1.0 nm para *B. subtilis* y 0.1 nm para *Pseudomonas* sp) en un espectrofotómetro Genesys 10S. Se tomaron 10 μL de *B. subtilis* y se sembraron por superficie usando un asa de Drigalsky. Una vez terminado el plateo, se tomaron 4 trozos de medio con crecimiento abundante de *Pseudomonas*.sp y se llevaron a la caja previamente plateada con *B. subtilis*, cada trozo equidistante del otro, se incubaron por 10 días a 30°C evaluando la aparición de halos alrededor de los trozos. La aparición de los mismos indicaría una relación de antagonismo en las cepas. Este ensayo contó con 2 tratamientos (*B. subtilis* en *Pseudomonas*.sp, *Pseudomonas*.sp en *B. subtilis*) 2 réplicas por microorganismo [21]

Producción de índoles totales (prueba dirigida a la evaluación de producción de AIA): El potencial de producción de índoles total del *Bacillus subtilis* y la *Pseudomonas* sp. Fue evaluado al sembrar las cepas en medio TSB suplementado con triptófano en 50 mg/mL. El cultivo se incubó a 30°C y 150 rpm por 48 horas y posteriormente, se procedió a la centrifugación de los cultivos a 450 rpm por 15 min. Se tomó 1 mL del sobrenadante de cada cultivo y se procedió a la mezcla con 4 mL del reactivo de Salkowsky, previamente preparado (150 μL de H_2SO_4 ; 250 mL de agua destilada; 7.5 mL al 0.5M de $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$). La mezcla se dejó en reposo por 5 minutos y se leyó su absorbancia a 535 nm usando un espectrofotómetro UV/VIS Genesys 10S. La concentración de estos índoles se determinó mediante una curva de calibración con una solución etanólica de 1 mg/mL de AIA entre 0-50 mg/mL [22]. Los tratamientos evaluados fueron los cultivos de *B. subtilis* B33, *Pseudomonas* sp. C41 y control sin cepa. La variable de respuesta (concentración de índoles totales) fue medida en $\mu\text{g/mL}$.

Potencial de solubilización de fosfatos: Con el fin de determinar el potencial solubilizador de fosfatos de las cepas evaluadas se preparó el medio NBRIP sólido [23] con algunas modificaciones, consistentes en el cambio de $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ por roca fosfórica. De esta manera el medio se componía de glucosa 10g, Ca_3PO_4 5g, $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 5g 0,25g, KCl 0,2g, roca fosfórica 0.1g, Agar 20g, H_2O destilada 1 L). Las cepas en estudio se sembraron en el medio y permanecieron en incubación por 10 días a 30°C y posteriormente se evaluó la capacidad de los microorganismos para solubilizar la roca fosfórica y crecer dentro del medio [21]. Los tratamientos evaluados fueron los cultivos de *B. subtilis* B33, *Pseudomonas*.sp. C41 y control sin cepa. La

variable de respuesta (crecimiento bacteriano) se determinó a partir de la aparición de colonias de cada cepa en el medio.

Potencial de fijación de nitrógeno: Para evaluar la capacidad de fijación de nitrógeno de los microorganismos de estudio, se procedió a la siembra de los microorganismos en el medio NFb semisólido [24], compuesto por ácido málico, 5 g/L; KOH, 4 g/L; K_2HPO_4 , 0.5 g/L; $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 0.2 g/L; $CaCl_2$, 0.02 g/L; NaCl, 0.1 g/L; $FeSO_4 \cdot 7H_2O$, 0.5; $NaMO_4 \cdot 2H_2O$, 2 mg/l; $MnSO_4 \cdot H_2O$, 10 mg/l; solución al 0.5% de azul de bromotimol en 0.2 M KOH, 2 ml; agar, 0.0175%, pH 6.8. Para ello, la biomasa obtenida después de la activación de las cepas se resuspendió en ADE (agua destilada estéril) y se centrifugó por 15 min a 4500 rpm, con el fin de realizar un lavado de la biomasa. Posteriormente se ajustó la concentración de la biomasa a una densidad óptica a 600 nm de 1.0 para *B. subtilis* y 0.1 para *Pseudomonas sp.* Se sembraron 20 μ L de la suspensión de cada cepa por inmersión en 10 mL del medio NFb semisólido presente en frascos de 26 mL cerrados herméticamente. Los cultivos se incubaron durante 10 días a 30°C. La presencia de manto microbiano fue tomada como indicador de crecimiento bacteriano y la actividad de fijación de nitrógeno por parte de las cepas, debido a que requiere de nitrógeno para crecer y el medio no lo provee [24]. Los tratamientos evaluados fueron los cultivos de *B. subtilis* B33, *Pseudomonas sp.* C41, Consorcio y control sin cepa. La variable de respuesta (crecimiento bacteriano) se determinó a partir de la aparición de un manto microbiano en el medio.

Producción de Lipopéptidos (LPs): Con el fin de evaluar la capacidad de las cepas de estudio para producir lipopéptidos, se preparó un preinóculo de 20 mL y se sembró una colonia, la cual se incubó a 150 rpm, 30°C por 24 h. Pasadas las 24 h se inoculó el medio (180 mL TSB) en Erlenmeyer de 2000 mL, este medio estuvo bajo 150 rpm y 30°C por 4 días. Pasadas 12 h de inoculación se adicionó 4% (p/v) de resina amberlita XAD-16 (Alfa Aesar) estéril. Después de los 4 días, se eliminó el sobrenadante y se realizaron lavados consecutivos de la amberlita con ADE y posteriormente con metanol. La solución resultante se rotoevaporó a 50°C y -50 psig de presión hasta obtener un residuo sólido el cual se resuspendió nuevamente en 3 mL de metanol. Esta suspensión se fraccionó en una columna SPEC18 (Solid Phase Extraction) siguiendo eluciones de 8 mL de acetonitrilo para limpiar la columna de extracción, metanol al 100%, agua, muestra, agua, metanol 50% y metanol al 100%. Las dos últimas eluciones fueron recolectadas en Erlenmeyer de 20 mL y nuevamente se llevaron al rotoevaporador a 50°C y -50 psig. El sólido obtenido se resuspendió en 2 mL de metanol, se almacenó en beaker de 10 mL y se secaron a 40°C. Una vez seco se resuspendió nuevamente en 1 mL de metanol y se llevó al secador en tubos eppendorf hasta la evaporación completa del solvente, se pesaron la cantidad del sólido y se ajustó su concentración en 50 mg/mL de metanol. Las muestras obtenidas se analizaron por cromatografía líquida (HPLC, Agilent 1200) en fase reversa empleando una columna Eclipse XDB C18 (250 x 4.6 mm, 5 μ m), una fase móvil A (agua grado HPLC +0.1% TFA) y B (acetonitrilo +0.1% TFA) con un flujo de 1 mL/min y con detección UV a 214 y 280 nm. El modo de operación fue gradiente (30/100/100% de B en 0/25/35 min), inyectando 40 μ L de la solución. [25].

Evaluación de la cinética de crecimiento de *B. subtilis* B33 y *Pseudomonas sp.* C41 a nivel de laboratorio en matraz

Para determinar la cinética de crecimiento de las cepas de estudio se prepararon los inóculos empleando una colonia del cultivo sólido de cada cepa en TSA 50% y se transfirieron individualmente a 50 mL de medio líquido TSB, incubando posteriormente por 24 h a 150 rpm y 30°C. Luego de 24 horas el cultivo se transfirió a 500 mL de medio TSB y este cultivo se incubó a las condiciones previamente enunciadas. Cada 2 horas hasta llegar a fase estacionaria se realizaron medidas de peso seco tomando 1 mL del cultivo, centrifugando a 14000 rpm por 10 min y resuspendiendo el pellet en ADE para realizar un lavado de la biomasa, centrifugando nuevamente el pellet a las condiciones anteriores y eliminando el sobrenadante para obtener sólo la biomasa; la cual se secó a 30°C en un horno por 48 horas. [25]. La determinación de consumo de sustrato se realizó tomando 1 mL de medio, centrifugando a 14000 rpm por 10 min y eliminando el precipitado. El sobrenadante se mezcló en relación 1:4 o 1:2, dependiendo de tiempo al cual correspondía la alícuota, con el reactivo DNS, se llevó a baño María 98°C por 5 min, se adicionó ADE y se leyó su absorbancia a 540 nm usando un espectrofotómetro UV/Vis Generys 10S [26]. La concentración de azúcares reductores se determinó mediante el método de DNS, usando una curva de calibración de glucosa como estándar [26]. Adicionalmente, se

realizó la determinación de unidades formadoras de colonia usando el medio TSA 50%. Para ello, se realizó la siembra por superficie de 100 mL de las diluciones seriadas (10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6}) e incubando por 48 horas a 30°C. Este muestreo contó con 2 muestras, una en el tiempo 8 horas y otra en el tiempo final de cinética de cada cultivo. La pureza de los cultivos se verificó en diferentes tiempos empleando un cultivo enriquecido por la técnica “Francés” y tinción de Gram [26].

Evaluar el efecto de la aplicación de un consorcio *Bacillus-Pseudomonas* en el desarrollo de cultivos de interés económico como frijol y banano a nivel invernadero

Con el fin de determinar el efecto de la aplicación de los microorganismos en estudio y el consorcio microbiano en frijol, se procedió inicialmente a realizar una prueba de germinación de las semillas de frijol (2571 de la marca Agrosemillas) en el sustrato a emplear en los diferentes experimentos. Para ello se realizó el lavado de las semillas tomando NaClO al 3% y sumergiendo las semillas por 10 min, lavando con ADE, sumergiendo nuevamente en etanol 75% y lavando en ADE [25]. Posteriormente, se realizó la siembra de las semillas empleando macetas con tierra negra (Vivero Tierra Negra, La Unión, Antioquia) y cizco de arroz en proporción 4:1. Se sembró una semilla por maceta y se organizaron en el invernadero de Ingeniería de Procesos de la Universidad EAFIT. Las macetas se regaron día por medio y se procedió a evaluar el porcentaje de germinación de las semillas como el número de semillas germinadas sobre el total de semillas sembradas.

Una vez determinado el porcentaje de germinación de las semillas, se procedió a realizar el montaje de evaluación del efecto de la inoculación sobre el crecimiento de las plántulas. Para ello se emplearon los siguientes tratamientos: semillas inoculadas con *B. subtilis* B33, semillas inoculadas con *Pseudomonas* sp. C41, semillas inoculadas con el consorcio *Bacillus-Pseudomonas*, semillas con aplicación de un fertilizante comercial (Urea marca Forza), empleado como control positivo; y finalmente un control absoluto sin aplicación de microorganismos, pero sí de agua. Para ello se cultivaron los microorganismos en medio TSB y se incubaron a 150 rpm y 30°C por 48 horas. Posterior a la fermentación, se realizó la recuperación de la biomasa centrifugando en tubos Falcon a 4500 rpm por 15 min, el pellet obtenido se resuspendió en ADE hasta obtener una concentración de 1×10^9 UFC/mL (concentración obtenida a partir de un ajuste de DO de 1.0 para *B. subtilis* y 0.1 para *Pseudomonas* sp) [25]. Para generar el consorcio se mezclaron dos partes iguales de cultivo, para el control positivo se pesaron 0.5 g de fertilizante y se aplicaron alrededor de donde se realizó la siembra de la semilla. Se tomaron medidas de longitud aérea (LA), número de hojas (NH), diámetro del tallo (DT) al inicio y final del tratamiento.

Para evaluar el efecto de la aplicación de los tratamientos enunciados en plantas de banano producidas desde meristemos (Raham Meristms, Meristemos de Colombia), se procedió a realizar unas medidas iniciales de la planta (LA, NH, DT) para evaluar la tasa de crecimiento al final del tratamiento. Para la aplicación del tratamiento de las plántulas de banano cv Williams, se sumergió la turba de la planta en las suspensiones mencionadas anteriormente por espacio de 1 h. Una vez cumplido el tiempo de residencia en la suspensión, se sembraron las plántulas en 3 Kg de tierra negra y cizco de arroz en proporción 4:1. Se llevaron a invernadero a temperatura ambiente y con riego de agua cada día por medio y un riego adicional con el tratamiento un mes después de la aplicación inicial. El tratamiento del fertilizante se realizó vertiendo alrededor de la plántula 0.5 g de producto [25]. Adicionalmente, se tuvo en cuenta el peso fresco de las plantas al inicio y final del tratamiento, como variable asociada al crecimiento y el peso seco al final del tratamiento.

El diseño experimental constó de un diseño unifactorial completamente aleatorio evaluando el factor Tratamiento en cinco niveles ((*Pseudomonas*.sp C41, *B. subtilis* B33, consorcio *Pseudomonas*-*B*-*subtilis*, control absoluto agua y control positivo fertilizante comercial) con 12 réplicas por tratamiento.

Evaluación de la viabilidad económica de la producción del bioinsumo para cultivos de interés económico

Con el fin de determinar la viabilidad económica de la producción del bioinsumo en desarrollo, se realizaron los diagramas de ingeniería del proceso: diagrama de bloques (BFD) y el diagrama de flujo de

proceso (PFD), con el fin de mostrar las diferentes etapas del proceso y las actividades que las conforman. La capacidad de producción se definió con 800 L por lote, la cual se estimó teniendo en cuenta las cifras del mercado en cuanto a la comercialización de fertilizantes a nivel nacional y el porcentaje que se deseaba captar de este. Posteriormente, se desarrolló la simulación del proceso con la capacidad de producción definida anteriormente haciendo uso del software SuperPro Designer, se desarrolló y se realizó un reporte de la evaluación económica en un rango de tiempo de 10 años de producción, obteniendo así los valores del valor presente neto (VPN), la tasa interna de retorno (TIR) y la relación beneficio-costos (B/C) para un escenario con un precio de venta determinado. Para desarrollar dicha evaluación se ingresaron los flujos de los equipos además de los costos del proceso y de capital. Para los costos de capital se tuvo en cuenta el costo total de los equipos sumando el costo asociado a la importación de los equipos (20% de tasa arancelaria y 19% del IVA), además de costos por instalación, adecuación del espacio y labores ingenieriles. De los costos de operación se tuvieron en cuenta el costo de la materia prima, costos de mano de obra, mantenimiento, repuesto y seguros. Los ingresos provienen de las ventas así que se estimó un precio de venta de \$25.000 por cada kg de producto, esto se debe a que el precio promedio que se maneja en el mercado basándonos en el precio de los agroquímicos y los bioinsumos que se comercializan de tipo granulado es de aproximadamente \$30.000.

Resultados y análisis

Evaluación a nivel *in vitro* del potencial promotor de crecimiento de los microorganismos empleados en el consorcio microbiano

Las cepas *Pseudomonas sp.* y *B. subtilis* fueron evaluadas en medio sólido enriquecido (TSA 50%) con el fin de determinar la actividad antagonista de una cepa sobre otra, lo cual en caso de presentarse, impediría el adecuado desarrollo y actividad del consorcio microbiano como suspensión y como formulado, posteriormente. Después de una semana de seguimiento no se registraron halos de inhibición en ninguna de las unidades evaluadas. Con esto se descarta inhibición entre *B. subtilis* y *Pseudomonas sp.* al menos a nivel *in vitro*, y se abre paso a las pruebas que tienen como objetivo conocer el potencial que tienen las cepas para ser PGPR. Se realizaron una serie de pruebas bioquímicas y microbiológicas encaminadas a evaluar el potencial de las cepas para promover el crecimiento vegetal a partir la producción de indoles totales, lipopéptidos, solubilización de fosfatos y fijación de nitrógeno ambiental. Se determinó la capacidad de producción de indoles totales (se sugiere que en gran medida sea ácido indol acético (AIA)) con valores de 19.6 µg/L para *Pseudomonas sp.* y 14.9 µg/L para *B. subtilis*. Estos valores se encuentran en un rango que sugiere que estos microorganismos podrían ser benéficos en cuanto a la producción de hormonas, y a que no sobrepasan concentraciones de más de 35 mg/mL, reportados de letéreos para las plantas [27]. Estos resultados concuerdan con investigaciones previas realizadas tanto para el género *Bacillus* como *Pseudomonas*, donde bajo técnicas de cuantificación similares se reportaron actividades de producción de indoles en valores entre 15 y 30 µg/L, aunque la cantidad generada variaba mucho de cepa en cepa [12] [28]. Sobre el potencial de fijación de nitrógeno, se evaluó la capacidad de las cepas para crecer en un medio que no proveía el nitrógeno requerido para el crecimiento bacteriano. Este ensayo se monitoreó por 10 días, tiempo en el cual se realizó un seguimiento del crecimiento de las cepas a partir de la aparición de un manto microbiano. Este manto fue apreciable a partir del cuarto día tanto para *Pseudomonas sp.* como para *B. subtilis*. Este resultado es acorde con lo reportado en previas investigaciones donde también se evaluó el potencial de fijación de nitrógeno en diversas cepas de *Bacillus* y *Pseudomonas* [29] [30] [31] [24]. Se determinó el potencial de ambas cepas para fijar el nitrógeno presente en el ambiente, incrementando la capacidad de adsorción radical de nitrato por parte de las plantas al tomar el N₂ del ambiente, alrededor del 78% del N₂ no es aprovechado por las plantas, y reducirlo a NH₃ para facilitar la incorporación de este compuesto a la planta huésped [32].

El potencial de las cepas para solubilizar el fosfato presente en el medio y aumentar la presencia de iones de fosfato aprovechables para el crecimiento vegetal, fue evaluado en medio sólido, el cual usaba roca fosfórica como fuente única de fosfato. Las cepas del consorcio se sembraron en el medio y estuvieron en monitoreo constante por 10 días para evaluar el crecimiento de colonias en el mismo, el cual fue apreciable a partir del tercer día de evaluación para ambas cepas. El uso de roca fosfórica en el medio se fundamenta en que el suelo tiene concentraciones altas de fósforo insoluble el cual puede ser solubilizado por las bacterias y

aprovechado posteriormente por las plantas para mejorar su crecimiento y rendimiento. Algunos investigadores prefieren realizar estas evaluaciones usando fosfato tricálcico en vez de roca fosfórica, pero en realidad este fosfato no se encuentra en el suelo, por lo que la roca fosfórica se prefiere sobre este otro compuesto, además de que es una alternativa más económica y con un menor impacto ambiental [33] [34]. Entre los géneros de bacterias identificados como organismos solubilizadores de fosfato (BSF) se han reportados *Bacillus* y *Pseudomonas* [35], con lo que se tiene más argumentos para sugerir que las cepas aquí estudiadas sí podrían mejorar la asimilación de fosfato del medio.

Se evaluó la producción de LPs, compuestos importantes por su potente actividad contra una amplia gama de organismos, incluidos hongos, bacterias, protozoos y plantas, con bajo nivel ambiental de toxicidad [36]. Se determinó que había una producción de LPs tanto para *B. subtilis* como para *Pseudomonas sp.* Además, empleando un patrón cromatográfico del HPLC para el *B. subtilis* EA-CB0575, el cual se sometió a espectrometría de masas posteriormente [25]. Se determinó la producción de fengicinas para el extracto metanoico recuperado por la columna SPE con 100% met, visible en los picos comprendidos entre 12.39 min hasta los 18.13 min de retención, además de la producción de surfactinas, presente en los picos de 24.5 min a 32.5 min de retención. Los picos a 19.283 y 20.324 min se sugieren que sean fengicinas e iturinas [37]

Ilustración 1. Cromatograma de producción de lipopéptidos para la *B. subtilis*

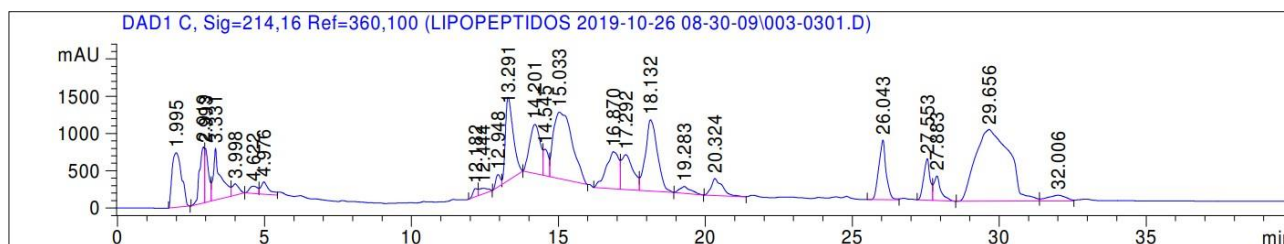
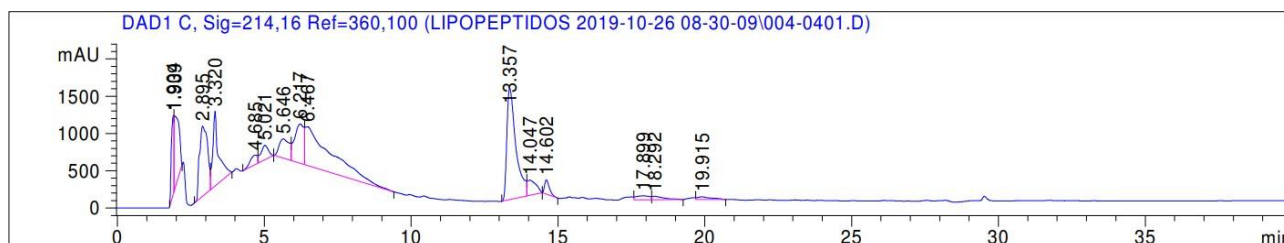


Ilustración 2. Cromatograma de producción de lipopéptidos para la *Pseudomonas sp.*



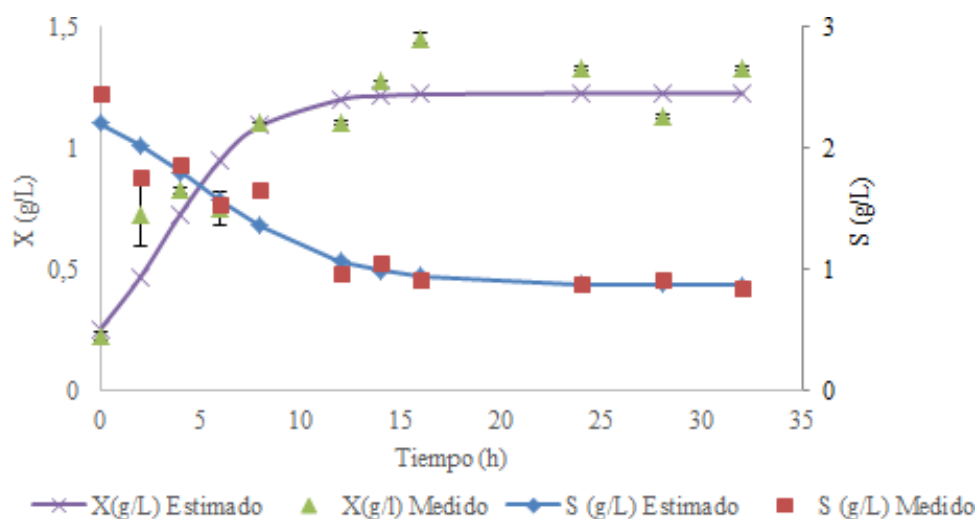
Para las *Pseudomonas*, se han identificado diversos compuestos con actividades antifúngicas, antibacterianas y compuestos que facilitan la formación de biopelículas y la proliferación de las bacterias en la rizosfera de los cultivos, entre estos compuestos se destacan: viscosina, orfamida, putisolvina, fenazina, entre otros [39], los cuales han sido identificados a partir de técnicas cromatográficas y con espectrometría de masas y se ha encontrado que su caracterización es compleja debido a que los tiempos de retención en las columnas son muy similares y en muchos casos ocurre un apantallamiento entre estos compuestos [39]. Los análisis cromatográficos obtenidos para la *pseudomonas sp.* C41, presentan una serie de picos entre los 5 y 10 min y 13.357 a los 19.915 min, tiempos de retención que concuerdan con estudios de caracterización realizados a condiciones similares al del presente estudio [40] [41], con los cuales se encontró presencia de viscosina y cromonona, sin embargo al no realizar una espectrometría de masas de los extractos metanoicos obtenidos de *Pseudomonas sp.* C41, sólo se sugiere la presencia de LPs.

Tabla 1. Tabla resumen de pruebas microbiológicas *in vitro*

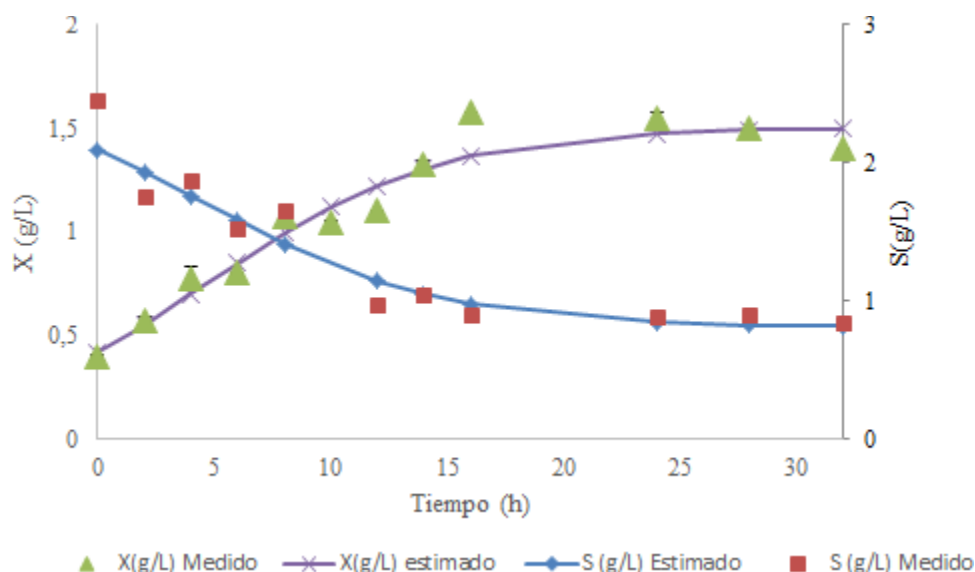
Prueba	<i>B. subtilis</i> B33	<i>Pseudomonas</i> sp. C41
Antagonismo Microbiano	X	X
Producción de índoles (µg/mL)	14.9	19.6
Solubilización de Fosfato	✓	✓
Fijación de Nitrógeno	✓	✓
Producción de LPs (Fengicina)	✓	X
Producción de LPs (Surfactina)	✓	X
Producción de LPs (Iturina)	✓	X
Producción de LPs (Otro)	X	✓

Evaluación de la cinética de crecimiento de *B. subtilis* B33 y *Pseudomonas* sp. C41 a nivel de laboratorio en matraz

Las cepas *Pseudomonas* sp. y *B. subtilis* fueron evaluadas, a partir de una cinética de crecimiento, en medio TSB con el fin de conocer sus parámetros cinéticos en el medio de cultivo seleccionado para su crecimiento. La Gráfica 1 presenta la curva de crecimiento de biomasa y consumo de sustrato en g/L para la *Pseudomonas* sp. En esta se observa que la cepa no presenta una fase de latencia significativa, esto debido a que el ensayo contó con un preinóculo de 12 h. La fase exponencial para este microorganismo tuvo una duración 12 h, tiempo en el cual se evidencia el crecimiento de la biomasa, la cual pasa de 0.2 g/L al inicio de la fermentación y finaliza con un valor de 1.1 g/L, la fase estacionaria tuvo una duración de 32 h, tiempo en el cual se dio por terminada la cinética de este microorganismo con una biomasa final de 1.3 g/L. Para el sustrato siguió un comportamiento en donde las concentraciones disminuían rápidamente en las primeras 12 h de fermentación, posterior a este tiempo la variación de la concentración fue a una tasa menor, obteniendo finalmente una concentración remanente del sustrato de 0.85 g/L. También se evaluó la cinética de crecimiento de *B. subtilis* B33, en el mismo medio de cultivo que se enunció previamente. Se encontró que esta cepa tampoco presentó una fase de latencia apreciable (Gráfica 2) y la curva de biomasa obtenida, describe un crecimiento exponencial durante las primeras 12 h de crecimiento, en este rango se logró alcanzar una biomasa de 1.6 g/L, posterior a esta fase se encuentra la fase estable donde la cual se mantuvo por 22 h alcanzando una concentración final para la biomasa de 1.5 g/L y el sustrato de 0.67 g/L. El sustrato también tuvo una tendencia de disminución de concentración rápida en las primeras 14 h y posterior a este tiempo su variación fue más estable.



Gráfica 1. Cinética de crecimiento de *Pseudomonas* sp. cepa C41



Gráfica 2. Cinética de crecimiento *B.subtilis* cepa B33

Los datos obtenidos por las cinéticas de crecimiento de cada microorganismo fueron evaluados a partir del modelo logístico para la biomasa y Luedeking Piret para el sustrato, obteniendo valores para el coeficiente de determinación corregido mayores al 96%. Los modelos empleados se determinaron parámetros como μ_{max} , X_0 , S_0 , $Y_{x/s}$, X_{max} son presentados en la Tabla 2, donde se aprecia una similitud entre los valores obtenidos experimentalmente durante las cinéticas.

Tabla 2. Parámetros cinéticos obtenidos para *B. subtilis* y *Pseudomonas. sp* a partir del modelo Logístico y Luedeking Piret

Parámetro	<i>B. subtilis</i> B33			<i>Pseudomonas. sp</i> C41		
	Estimado	Experimental	Error (%)	Estimado	Experimental	Error (%)
X_0 (g/L)	0.42	0.40	4.96	0.25	0.22	12.26
X_m (g/L)	1.51	1.575	4.44	1.22	1.45	15.62
S_0 (g/L)	2.64	2.83	6.54	2.09	2.83	26.13
$Y_{x/s}$	0.52	0.68	23.72	0.85	0.90	5.63
μ_m (h^{-1})	0.20	0.25	19.25	0.43	0.37	16.58

En contraste con parámetros obtenidos a partir de investigaciones anteriores se encuentra que para el *B. subtilis*, evaluado en un medio previamente optimizado (glucosa, 1.0%; Peptona, 3.0%; $MgSO_4$, 0.2% y $CaCl_2$ 0.5%) a un pH de 7, temperatura de 37°C por 24 h, obtiene unos parámetros estimados μ_m , X_m y $Y_{X/S}$ de $0.364h^{-1}$, 2.88 g/L y 2.3 respectivamente [42]. En comparación con los parámetros obtenidos en este estudio, muestran que la cinética trabajada bajo el medio TSB y las condiciones no son la más viable para obtener altas concentraciones de biomasa en el tiempo para este microorganismo, además con este medio se logra un rendimiento de biomasa bajo, por lo que alrededor del 50% del sustrato no es aprovechado para su producción, por lo que se sugiere realizar una optimización del medio de cultivo, ya que se han reportado estudios donde al realizarlo se alcanzan valores de $Y_{x/s}$ 1.8 g/g [25] u optimizar variables de operación como pH o Temperatura. Para *Pseudomonas* evaluada en medio TSB a 30°C, se reporta un estudio anterior donde se trabajó bajo condiciones similares con otra cepa del género *Pseudomonas*, el cual obtuvo una μ_{max} de $0.13h^{-1}$, $Y_{x/s}$ de 0.53 y X_{max} 1.7 g/L [43], indica una similitud en algunos parámetros y un rendimiento mayor en otros (μ_{max} , $Y_{x/s}$) aunque el comportamiento cinético obtenido es similar, la cantidad de biomasa no es

suficiente para un proceso donde la producción de biomasa es tan significativa, por lo que realizar una optimización del medio para beneficiar aún más la su producción resulta factible.

Evaluar el efecto de la aplicación de un consorcio *Bacillus-Pseudomonas* en el desarrollo de cultivos de interés económico como frijol y banano cv Williams a nivel invernadero

Evaluación del Banano cv Williams: La evaluación en campo del consorcio microbiano (*Pseudomonas sp.* y *B. subtilis*) y los microorganismos individuales se realizó en plantas de banano cv Williams y frijol cargamanto rojo. Para el cultivo de banano se evaluó tasa de crecimiento de la planta a partir de los parámetros número de hojas (NH), diámetro del tallo (DT) y la longitud aérea (LA), variables que también han sido utilizadas en otras investigaciones para determinar el crecimiento nivel invernadero [44]. Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 3, donde se presenta la significancia, obtenida con el método de Dunnett, de cada tratamiento comparado con el control negativo (agua). De este análisis se obtuvo que la variable LA no presenta diferencias significativas entre tratamientos, resultado positivo si se tiene en cuenta de que el control positivo es un fertilizante comercial que tiene asociado numerosos impactos negativos. Además, las variables DT si tienen diferencias significativas para el tratamiento fertilizante comercial, con una tasa de crecimiento del diámetro del tallo mayor a la presentada por los demás tratamientos, para NH, evaluado a partir del test Kruskal-Wallis, el fertilizante comercial tuvo diferencia significativa, sin embargo el consorcio y *B. subtilis* B33 presentan una mediana alta, por lo que puede ser viable para promover el crecimiento en este cultivo y presentar diferencias significativas en un tiempo de estudio mayor, como se ha encontrado en diversas investigaciones sobre el tema, donde el tiempo de evaluación es de más de 3 meses, ya que algunas variables de respuesta pueden presentar una diferencia mayor al poder tener más tiempo para interactuar con el tratamiento aplicado [44]

Tabla 3. Resultados de la prueba invernadero de los microorganismos evaluados en un cultivo de interés económico (Banano cv Williams)

Tratamiento	LA (cm)	Valor-P	DT (mm)	Valor-P	NH	Valor-P
Control absoluto (Agua)	0.69 ± 0.06	--	3.17 ± 0.12 a	--	2.83 ± 0.11 a	--
<i>Bacillus subtilis</i> B33	0.68 ± 0.06	1	3.87 ± 0.15 a	0.66	3.42 ± 0.08 a	0.56
<i>Pseudomonas sp.</i> C41	0.67 ± 0.04	1	2.39 ± 0.11 a	0.57	1.92 ± 0.04 a	0.19
Consorcio (<i>Pseudomonas sp.</i> C41 y <i>Bacillus subtilis</i> B33)	0.89 ± 0.06	0.87	4.15 ± 0.017 a	0.37	2.75 ± 0.15 a	0.99
Control positivo Fertilizante químico (urea)	0.74 ± 0.05	0.99	9.48 ± 0.11 b	0.00	4.08 ± 0.08 b	0.049

Evaluación del frijol cargamanto rojo: Para el cultivo de frijol cargamanto rojo se realizó una prueba inicial de germinación con la cual se determinaron las unidades de estudio requeridas para la prueba en invernadero. Esta prueba de germinación contó con 19 unidades experimentales las cuales contenían tierra negra abonada en donde se sembró una semilla REGICA 2571 de la marca Agrosemillas. El monitoreo continuo de las unidades experimentales por espacio de 2 semanas dio como resultado una germinación del 100%, es decir, 19 de las 19 semillas presentaron germinación. Con base en el ensayo enunciado, el espacio de invernadero disponible y los recursos asociados a los ensayos, se definió que para el siguiente ensayo se trabajaría con 12 unidades experimentales.

Para evaluar el efecto de la aplicación de los diferentes tratamientos sobre el crecimiento y desarrollo del frijol cargamanto se aplicaron los tratamientos y se monitorearon por un período de 38 días. Se realizaron mediciones de número de hojas (NH), diámetro del tallo (DT), longitud aérea (LA) y el área foliar (AF). Adicionalmente se evaluó la cantidad de semillas germinadas por tratamiento. El fertilizante comercial fue el que menos porcentaje de germinación obtuvo a pesar de usar la dosificación sugerida para los cultivos, las

unidades del control negativo fueron las de mayor porcentaje de germinación (83.3%) y las unidades inoculadas con los microorganismos obtuvieron un porcentaje de germinación intermedio (66.7% y 58.3%). Este comportamiento puede deberse a una inhibición del crecimiento por parte de los tratamientos evaluados, ya que se observó además que las unidades del tratamiento fertilizante tenían un crecimiento más lento y una morfología diferente a las esperadas, mayor ramificación, color más oscuro y hojas más pequeñas; estas características de crecimiento han sido evaluadas en previas investigaciones donde para otros cultivos fertilizados con urea y otros agroquímicos presentan problemas de germinación, crecimiento y rendimiento de la planta. [45]. Adicionalmente, se han encontrado reportes donde los bioinsumos a partir de PGPR también pueden retrasar o inhibir el crecimiento de algunos de los cultivos por altas concentraciones de índoles [46], lo cual no aplica para este tipo de bacterias por lo reportado en análisis anteriores, aunque podría ser causa, algunas otras sustancias no evaluadas en esta investigación.

Tabla 4. Porcentaje de germinación por tratamiento para las semillas de frijol cargamanto rojo a nivel de invernadero

Tratamiento	% Germinación
<i>Pseudomonas</i> sp. C41	66.7
<i>Bacillus subtilis</i> B33	58.3
Consortio (<i>Pseudomonas</i> sp. C41 y <i>Bacillus subtilis</i> B33)	66.7
Control absoluto (Agua)	83.3
Control positivo Fertilizante químico (Urea)	33.3

Se realizó un análisis estadístico para cada una de las variables de respuesta empleando el método de Dunnett, esto con el fin de comparar cada tratamiento con un control que en este caso es el control absoluto (Agua) y los resultados se encuentran en la Tabla 5. Para LA existe una diferencia significativa entre el tratamiento *Pseudomonas* sp. C41 y el control, siendo mejor el segundo. En el caso de AF también hay una diferencia significativa entre el tratamiento de fertilizante químico y el control, siendo mejor este último, además es un resultado positivo ya que indica que el uso de fertilizante disminuye el AF en los cultivos. Para DT y NH no se encontró una diferencia significativa entre los tratamientos y el control. Adicionalmente, para NH se realizó el test de Kruskal-Wallis y efectivamente se obtuvo que todas las medianas de los diferentes tratamientos son iguales.

Tabla 5. Resultados de la prueba invernadero de los microorganismos evaluados en un cultivo de interés económico (Frijol cargamanto rojo)

Tratamiento	LA (cm)	Valor-P	DT (mm)	Valor-P	NH	Valor-P	AF (cm ²)	Valor-P
Control absoluto (Agua)	84.84 ± 1.38 a	--	4.15 ± 0.03	--	19.1 ± 0.28	--	85.64 ± 144 a	--
<i>Bacillus subtilis</i> B33	70.03 ± 1.72 a	0.36	4.43 ± 0.07	0.56	19.14 ± 0.41	1	76.7 ± 4.97 a	0.93
<i>Pseudomonas</i> sp.C41	42.3 ± 1.18 b	0.00	4.34 ± 0.04	0.39	19.13 ± 0.53	1	88.84 ± 2.17 a	0.99
Consortio_ (<i>Pseudomonas</i> sp.C41 y <i>Bacillus subtilis</i>)	80.72 ± 1.49 a	0.978	4.51 ± 0.08	0.74	20.13 ± 0.3	0.99	90.68 ± 3.18 a	0.98
Control positivo Fertilizante químico (Urea)	69 ± 12.25 a	0.46	4.35 ± 0.77	0.99	19.25 ± 3.92	1	38.9 ± 13.85 b	0.03

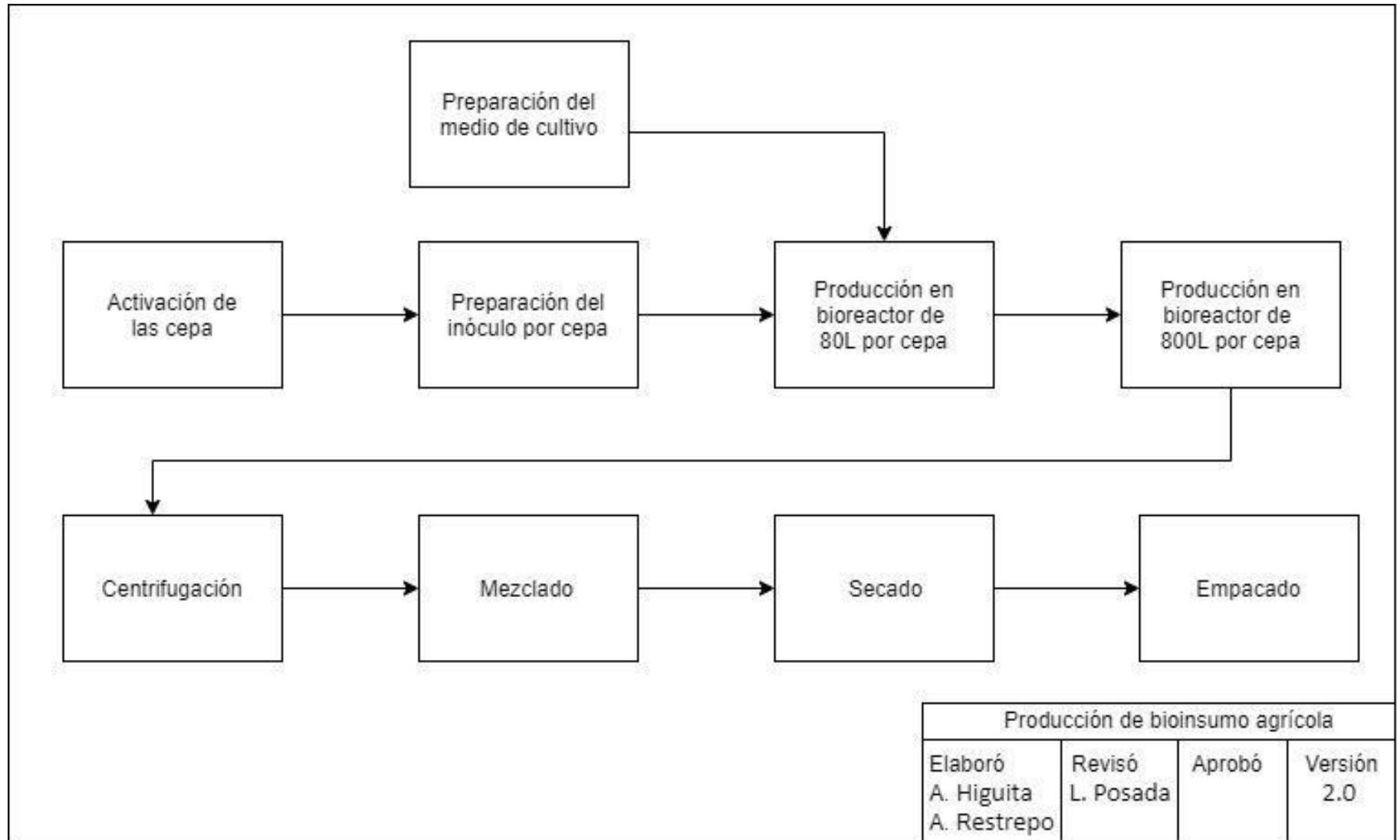
Aunque el consorcio (*Pseudomonas* sp.C41 y *Bacillus subtilis* B33) estadísticamente no es significativamente diferente al control, es importante resaltar que en todas las variables de respuesta a excepción de LA obtuvo la mayor media. Esto es algo positivo debido a que las plantas con el paso del tiempo

necesitan nutrientes los cuales no obtendría con solamente el control, es por esto que el consorcio es una buena opción para el desarrollo y crecimiento de la planta.

Evaluación de la viabilidad técnico-económica de la producción del bioinsumo para cultivos de banano y frijol:

Para evaluar la viabilidad técnico-económica de la producción de un bioinsumo con base en un consorcio microbiano con *B.subtilis* B33 y *Pseudomonas.sp.* C41, se realizaron los diagramas correspondientes al proceso, BFD (Ilustración 3), en este se muestran las diferentes etapas del proceso y las actividades que las conforman. Adicionalmente se realizó el PFD (Ilustración 4) en el cual se observa el diagrama del proceso, además de la receta de este; ya que el proceso es de tipo batch o lotes y sus corrientes se encuentran reportados dentro del diagrama.

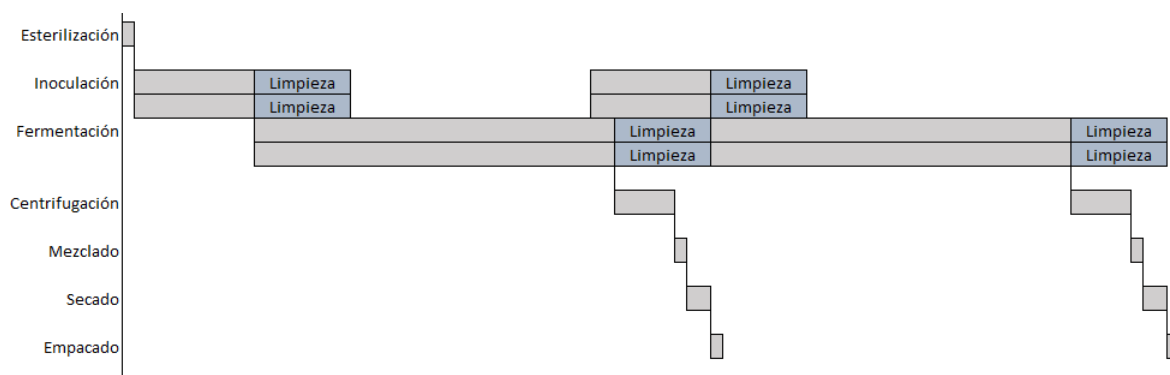
Ilustración 3. Diagrama genérico de bloques del proceso productivo del bioinsumo



Producción de bioinsumo agrícola			
Elaboró A. Higuita A. Restrepo	Revisó L. Posada	Aprobó	Versión 2.0

Posteriormente se realizó un diagrama de Gantt (Ilustración 5) para la distribución del tiempo de un lote de producción. La etapa de esterilización dura 1 hora, luego la inoculación tarda 10 horas y la fermentación 30 horas. Estas dos últimas se hacen en paralelo debido a que existen dos cepas distintas y así se evita contaminación en los bioreactores, además después de ambas etapas se realiza una limpieza de 8 horas, para esto se almacena el producto de la fermentación en unos tanques que luego entran a la siguiente etapa. La centrifugación se demora 5 horas, el mezclado 1 hora, el secado 2 horas y por último el empaclado tarda 1 hora.

Ilustración 5. Diagrama de Gantt para dos lotes de producción



La comercialización de fertilizantes en Colombia ha alcanzado una cifra de aproximadamente 2.578.746 Ton anuales. El proceso productivo para el desarrollo del bioinsumo agrícola con base en un consorcio microbiano, siguiendo las bases de cálculos reportadas en la Tabla 6, obtiene una producción de aproximadamente 248 Ton anuales, lo cual representa un 0,01% en este mercado objetivo.

Tabla 6. Bases de cálculo para el proceso productivo del bioinsumo

Tiempo de producción por batch (horas)	50
Tiempo de producción anual (horas)	8250
Tiempo de producción anual (días)	343,75
Número de batches al año	165
Tamaño del batch (kg)	1500
Porcentaje a captar del mercado de fertilizantes en Colombia	0,01%
Tiempo para mantenimientos y paro de equipos (días)	21,25
Tiempo para mantenimientos y paro de equipos (horas)	510

Con base en estos datos anteriores, se simuló el proceso productivo en el software SuperPro Designer, en el cual se calcularon los indicadores económicos para evaluar la viabilidad del proceso en una proyección de 10 años. En la Tabla 7 se pueden observar los datos obtenidos en el estudio económico. En los anexos se encuentran todos los costos discriminados para cada uno de los rubros que contiene los diferentes indicadores económicos. Se determinó un VPN de \$18.507.781.650 con una inflación del 7%, una B/C de 4.11, es decir, que los beneficios son 4.11 veces los costos del proceso y una TIR de 62.42%. Estos valores nos muestran que el escenario presenta una viabilidad tanto técnica como económica, debido a que el VPN es positivo indicando que el valor de la inversión aumentará, y la TIR es de 62.42%, siendo esta mayor a la tasa de oportunidad empleada que es del 4.48%.

Tabla 7. Indicadores económicos del proceso productivo

Inversión de capital total (\$)	3.036.246.150
Inversión de capital cargada a este proyecto (\$)	3.036.246.150
Costo de operación (\$/año)	1.485.677.250
Ingresos (\$/año)	6.127.137.900
Tamaño de lote (kg MP)	1.501,54
Costo Tasa anual (kg MP/año)	247.754
Costo unitario de producción (\$/kg MP)	6.011
Costo neto de producción unitario (\$/kg MP)	6.011
Ingresos de producción unitaria (\$/kg/MP)	24.727
Margen bruto (%)	75,74
Retorno de la inversión (%)	100,52
Tiempo de recuperación (años)	0,99
TIR (después de impuestos) (%)	62,42
VPN (al 7,0% de interés) (\$)	18.507.781.650

Conclusiones

Las cepas *Pseudomonas sp* C41 y *Bacillus subtilis* B33 obtenidas del cepario previamente aislado a nivel de invernadero de plantas de banano variedad Calcutta 4 y Williams respectivamente, son potenciales promotoras de crecimiento vegetal debido a los resultados obtenidos en cuanto a la producción de índoles totales y lipopéptidos, solubilización de fosfatos y fijación de nitrógeno, mecanismos por los cuales los microorganismos mejoran el crecimiento vegetal y/o sanidad de las plantas. Los resultados indican una producción de índoles totales de 14.9 µg/mL y de 19.6 µg/mL. En cuanto a la producción de LPs, el *B. subtilis* B33 produce fengicinas, surfactinas e iturinas. La *Pseudomonas. sp* C41 produce otros LPs no identificados en este estudio. Ambas cepas son capaces de solubilizar fosfato usando roca fosfórica como fuente de fósforo y pueden fijar el N₂ del aire para que sea aprovechable por la planta huésped. Adicionalmente, como no se presentó una inhibición entre las cepas del consorcio, se considera que es viable desarrollar un bioinsumo *B. subtilis-Pseudomonas sp.* para promover el crecimiento vegetal de los cultivos de interés económico del país, que para este caso se enfocó en el cultivo de banano cv Williams y frijol cargamanto rojo.

Al evaluar la inoculación de las cepas individuales de *B. subtilis* B33, *Pseudomonas sp.* C41 y el consorcio 1:1 de ambas cepas en plantas de banano cv Williams y frijol cargamanto rojo, cultivos de interés económico seleccionados, se encontró que para algunas variables evaluadas para el cultivo de banano cv Williams, no hay diferencias significativas entre los tratamientos con las bacterias y el fertilizante comercial y en otras variables como NH, la diferencia es significativa para el tratamiento del fertilizante comercial, aunque la tasa de crecimiento obtenida es similar a la reportada por algunos de los tratamientos con bacterias. En el cultivo de frijol, algunas de las variables evaluadas no presentaron diferencias significativas entre los tratamientos y para otras variables, como DT, AF y % germinación, el fertilizante presentó un rendimiento inferior a los tratamientos con bacterias, por lo que el uso de bioinsumos con bacterias promotoras del crecimiento se presenta como una alternativa viable para la fertilización de este cultivo.

El desarrollo un bioinsumo con base en un consorcio microbiano con *Bacillus subtilis* B33 y *Pseudomonas.sp* C41 con una producción del 0.01% del mercado objetivo, equivalente a 800L por lote con 165 lotes al año para un total de 8250 de horas trabajas incluyendo tiempos de limpieza y con una proyección a 10 años y un precio de venta de \$25.000, en términos técnico-económico es rentable, debido a que el valor obtenido del VPN el cuales de \$18.507.781.650 es positivo, además la TIR de 62.42% es mayor a la tasa de oportunidad del 4.48% y el tiempo de recuperación de la inversión es de 1 año. Es por esta razón que se considera viable la producción del bioinsumo agrícola, además de ser empleado en cultivos de interés económico para el país.

Tabla de Anexos o Apéndices

Si se considera que se debe incluir información adicional para la comprensión del proyecto de grado se debe entregar esta documentación en formato digital, agregándola a una carpeta de Google Drive y compartiendo el enlace corto en la Tabla 1.

Tabla 1. Documentos adicionales incluidos con el proyecto de grado.

Nombre	Desarrollo (propio/terceros)	Tipo de Archivo	Enlace google drive (https://goo.gl/)
Rubros	Propio	PDF	https://drive.google.com/file/d/1Y4dP4vN0YBKVsSX3QIXLkjQHq1tzyZP1/view?usp=sharing

REFERENCIAS

- [1] S. d. a. D. Colombia, «Datos abiertos gobierno nacional de Colombia,» 2017. [En línea]. disponible: <https://www.datos.gov.co/browse?q=Produccion+de+cultivos+en+el+departamento+antioque%C3%B1o+&sortBy=relevance&page=4>. [Último acceso: 20 08 2018].
- [2] FENALCE, «Indicadores Cerealistas,» 2018. [En línea]. Disponible: <http://www.fenalce.org/archivos/indicerealista2018A.pdf>. [Último acceso: 27 02 2019].
- [3] A. O. H. y. M. C. S, «Coyuntura Bananera 2018,» 2018. [En línea]. Disponible: <http://www.augura.com.co/wp-content/uploads/2019/04/COYUNTURA-BANANERA-2018.pdf>. [Último acceso: 04 08 2019].
- [4] O. M. d. I. Salud, «Residuos de plaguicidas en los alimentos,» 19 02 2018. [En línea]. Disponible: <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/pesticide-residues-in-food>. [Último acceso: 17 04 2019].
- [5] R. K. W. S. y. R. Johan, «Planetary Boundaries: Guiding Human Development on a Changing Planet,» *Science*, vol. 347, 2015.
- [6] M. P. y. C. Muñoz, «Agricultores red de especialistas en agricultura,» 25 06 2015. [En línea]. Disponible: https://www.agroindustria.gob.ar/sitio/areas/escuelagro/_archivos//000001_Biotecnologia-%20innovaciones%20sustentables/000000_Bioinsumos%20Agropecuarios%20y%20Biomateriales/000000_Bioinsumos.pdf. [Último acceso: 19 08 2018].
- [7] J. W. S. M. Kloepper, «Plant growth promoting rhizobacteria on radishes,» de *Plant growth promoting rhizobacteria on radishes*, 1978, pp. 879-882.
- [8] I. C. Agropecuario, «ICA,» 23 08 2019. [En línea]. Disponible: <https://www.ica.gov.co/areas/agricola/servicios/fertilizantes-y-bio-insumos-agricolas/listado-de-bioinsumos/2009/empresas-registradas-bioinsumos-julio-8-de-2008.aspx>. [Último acceso: 18 10 2019].
- [9] I. C. Agropecuario, «ICA,» 23 08 2019. [En línea]. Disponible: <https://www.ica.gov.co/getdoc/2ad9e987-8f69-4358-b8a9-e6ee6dcc8132/productos-bioinsumos-mayo-13-de-2008.aspx>. [Último acceso: 18 10 2019].
- [10] M. R. T. y. V. V. E. L. F. P. Uribe, «Effect of medium components and culture conditions in *Bacillus*» *Bioprocess Biosyst Eng*, n° 38, pp. 1879-1881, 2015.

- [11] D. J. I. M. T. y. R. B. E. E. Idris, «Tryptophan-Dependent Production of Indole-3-Acetic Acid (IAA) Affects Level of Plant Growth Promotion by *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42» *Molecular Plant-Microbe Interactions*, vol. 20, pp. 619-626, 2007.
- [12] L. F. Posada, «Promoción de crecimiento vegetal de *Bacillus subtilis* EA-CB0575, colonización rizosférica y potencial genómico y bioquímico,» Medellín, 2017.
- [13] «Core,» [En línea]. Disponible: <https://core.ac.uk/download/pdf/47250418.pdf>. [Último acceso: 10 12 2018].
- [14] U. N. d. Colombia, «Bdigital unal,» [En línea]. Disponible: <http://bdigital.unal.edu.co/57419/1/43979285.2017.pdf>. [Último acceso: 10 12 2018].
- [15] S. I. M. y. T. S. A. O. A. Almaghrabi, «Influence of inoculation with plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) on the growth of tomato plants and the reproduction of nematodes under greenhouse conditions,» *Saudi Journal of Biological Sciences*, vol. 20, n° 1, pp. 57-61, 2013.
- [16] H. A. P. Z. W. y. J. M. V. Y. He, «Co-inoculation of *Bacillus spp.* and *Pseudomonas putida* at different development stages acts as a biostimulant to promote growth, yield and nutrient uptake of tomato,» *Journal of Applied Microbiology*, vol. 1, n° 127, pp. 196-207, 2019.
- [17] L. Braga, «Evaluación de la capacidad promotora del crecimiento vegetal de una cepa de *Pseudomona fluorescens* y la influencia de su inoculación sobre la comunidad microbiana de la rizosfera de alfafa».
- [18] C. P. N. y. N. S. C. R. T. Gutierrez, «Influencia de la inoculación de rizobacterias sobre la germinación de semillas de frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.)» *Centro Agrícola*, vol. 2, n° 30, pp. 56-60, 2003.
- [19] J. G. A. N. y. T. C. Acosta, «Aislamiento, caracterización molecular y evaluación de cepas fijadoras de nitrógeno en la promoción del crecimiento de frijol,» *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*, vol. 6, pp. 929-942, 2015.
- [20] «Repositorio La Molina,» [En línea]. Disponible: <http://repositorio.lamolina.edu.pe/bitstream/handle/UNALM/2681/P34-V5-T.pdf?sequence=1&isAllowed=y>. [Último acceso: 20 04 2019].
- [21] U. EAFIT, «Protocolo de Rizobacterias- Cuaderno de Protocolos,» Medellín, 2019.
- [22] C. L. y. G. B. R. Patten, «Role of *Pseudomonas putida* Indoleacetic Acid in Development of the Host Plant Root System,» *Applied and Environmental Microbiology*, vol. 68, n° 8, 2002.
- [23] CIBIOP, «Manual de Rizobacterias,» Medellín.
- [24] M. Daniel, «Evaluación del efecto de la inoculación de *Bacillus spp.* con potencial fijador de nitrógeno en cultivos de *Chlorella Sorokiniana*» Medellín, 2015.
- [25] L. F. Posada, «DISEÑO CONCEPTUAL DEL PROCESO PRODUCTIVO DE LA CEPA *Bacillus subtilis* EA-CB0575 PARA LA PROMOCIÓN DE CRECIMIENTO DE Musa AAA,» Medellín, 2019.
- [26] U. E.-. L. d. Bioprocesos, «Protocolos de laboratorio,» Medellín.
- [27] D. E. C. Suarez, R. Puga-Freitas, P. Avelle, Elena Velasquez y M. Bloui, «Combined effects of earthworms and IAA-producing rhizobacteria on plant growth and development,» *Applied Soil Ecology*, vol. 80, pp. 100-107, 2014.

- [28] J. D. F.-M. e. al, «AISLAMIENTO Y CARACTERIZACIÓN DE RIZOBACTERIAS,» *Biológicas*, pp. 24-34, 2017.
- [29] F. Yu, X. Jing, X. Li y H. Wang, «Recombineering *Pseudomonas protegens* CHA0: An innovative approach that improves nitrogen fixation with impressive bactericidal potency,» *Microbiological Research*, vol. 2018, pp. 58-65, 2019.
- [30] A. Majeed, M. K. Abbasi, S. Hameed, S. Yasmin y M. Kashi, «*Pseudomonas* sp. AF-54 containing multiple plant beneficial traits acts as growth enhancer of *Helianthus annuus* L. under reduced fertilizer input,» *Microbiological Research*, vol. 216, pp. 56-69, 2018.
- [31] A. Hashem, B. Tabassum y E. Fathi, «*Bacillus subtilis*: A plant-growth promoting rhizobacterium that also impacts biotic stress,» *Saudi Journal of Biological Sciences*, vol. 26, pp. 1291-1297, 2019.
- [32] C. B. Lobo, M. S. Tomás y Emilce Viruel, «Development of low-cost formulations of plant growth-promoting bacteria to be used as inoculants in beneficial agricultural technologies,» *Microbiological Research*, vol. 219, pp. 12-25, 2019.
- [33] J. G. R. Gil, L. O. Bedoya, N. W. O. Vega y J. G. M. Osorio, «Alternativas Microbiológicas para Mejorar el Crecimiento del Caupí,» *Revista Facultad Nacional de Agronomía Medellín*, vol. 66, n° 92, 2013.
- [34] L. e. d. Klaic, A. S. Giroto, G. G. Guimarães, F. Plotegher, C. Ribeiro, T. C. Zangirolami y C. S. Farinas, «Nanocomposite of starch-phosphate rock bioactivated for environmentally-friendly fertilization,» *Minerals Engineering*, vol. 128, pp. 230-237, 2018.
- [35] M. E. B. Pineda, «La solubilización de fosfatos como estrategia microbiana,» *Corpoica Cienc. Tecnol. Agropecu.*, vol. 15, n° 1, pp. 101-113, 2014.
- [36] S. Chandler, N. V. Hese, F. Coutte, P. Jacques y M. Höfte, «Role of cyclic lipopeptides produced by *Bacillus subtilis* in mounting induced immunity in rice (*Oryza sativa* L.),» *Physiological and Molecular Plant Pathology*, vol. 91, pp. 20-30, 2015.
- [37] E. V. Valeska, «Identificación y caracterización de extractos bacterianos biológicamente activos contra patógenos de *Musa sp.*,» Bogotá, 2012.
- [38] L. e. d. a. a. e. p. d. W. Xia, Z. Du, Q. Cui, H. Dong, F. Wang, P. Él y Y. Tang, «Biosurfactant produced by novel *Pseudomonas* sp. WJ6 with biodegradation of n-alkanes and polycyclic aromatic hydrocarbons,» *Journal of Hazardous Materials*, vol. 276, pp. 489-498, 2014.
- [39] J. M. Raaijmakers, I. d. Bruijn, O. Nybroe y M. Ongena, «Natural functions of lipopeptides from *Bacillus* and *Pseudomonas*: more than surfactants and antibiotics,» *FEMS Microbiol Rev*, vol. 34, pp. 1037-1062, 2010.
- [40] M. V. Laycock, P. D. Hildebrand, P. Thibault, J. A. Walter y J. L. C. Wright, «Viscosin, a Potent Peptidolipid Biosurfactant and Phytopathogenic Mediator Produced by a Pectolytic Strain of *Pseudomonas fluorescens*,» *Journal Agriculture food and chemistry*, vol. 39, pp. 493-489, 1991.
- [41] D. Illakkiam, P. Ponraj, M. Shankar, S. Muthusubramanian y J. Rajendhran, «Identification and Structure Elucidation of a Novel Antifungal Compound Produced by *Pseudomonas aeruginosa* PGPR2 Against *Macrophomina phaseolina*,» *Biotechnology and Applied Biochemistry*, vol. 171, pp. 2176-2185, 2013.
- [42] R. Vinayagam, R. Murty y M. Chandrasekaran, «Development of a Simple Kinetic Model and Parameter

Estimation for Biomass and Nattokinase Production by *Bacillus subtilis* 1A752,» vol. 2, n° 1, 2015.

- [43] C. A. B. MEJÍA, «Optimización de un medio de cultivo para la producción de biomasa de la cepa *Pseudomonas putida* UA 44 aislada del suelo bananero de Uraba–Antioquia,» Medellín, 2007.
- [44] M. C. M. M. S. R. S. S. F. R. R. Gamez, «Screening, plant growth promotion and root colonization pattern of two rhizobacteria (*Pseudomonas fluorescens* Ps006 and *Bacillus amyloliquefaciens* Bs006) on banana cv. Williams (*Musa acuminata* Colla),» *Microbiological Research*, pp. 12-20, 2012.
- [45] J. M. BREMNER y M. J. KROGMEIER, «Elimination of the adverse effects of urea fertilizer on seed germination, seedling growth, and early plant growth in soil,» *Agricultural Sciences: Bremner and Krogmeier*, vol. 85, pp. 4601-4604, 1998.
- [46] J. S. Arango, E. G. Ramelli y J. C. P. Naranjo, «Evaluación de microorganismos con potencial de promoción de crecimiento vegetal y biocontrol de *Spongospora subterranea*,» *Revista Colombiana de Biotecnología*, vol. 14, n° 1, 2012.
- [47] BIOinTropic, «Informe sectorial 1 Biocontrol de plagas y enfermedades en la agricultura» Corporación BIOINTROPIC, Medellín, 2018.
- [48] B. L. y. F. Kamilova, «Plant-growth-promoting rhizobacteria,» *Annual Review of microbiology*, vol. 1, n° 63, pp. 541-556, 2019.
- [49] A. E. Q. SEDANO, «Modelamiento matemático de la fenomenología de crecimiento de *pseudomonas putida* a partir de la cinética utilizando glicerol como sustrato,» Lima, 2018.
- [50] C. A. G. a. L. D. Bailey, «Effect of seed-placed urea fertilizer and N-(n-butyl)thiophosphoric triamide (NBPT) on emergence and grain yield of barley» *Agriculture and Agri-Food Canada*, 1999.