

**PROCESO PARA LA ELABORACION DE UN BIOFERTILIZANTE, QUE
COMPRENDE FERMENTACION EN ESTADO SOLIDO, INMOVILIZACION
A TRAVES DE NANOPARTICULAS DE ALOFAN Y UNA NUEVA
FERMENTACION; Y BIOFERTILIZANTE.**

5

SECTOR TECNICO

La presente tecnología está orientada al sector agropecuario, principalmente a la industria agrícola. Esta tecnología permite mejorar el suelo de cultivo, permitiendo incrementar la disponibilidad de nutrientes cuando la
10 planta lo requiera.

TECNICA ANTERIOR

La necesidad de producir alimentos en grandes cantidades y en un muy
15 corto tiempo, han provocado un cambio en la agricultura tradicional, permitiendo obtener altos rendimientos en los cultivos. Sin embargo, los altos rendimientos se basan en el uso de fertilizantes los cuales a su vez demandan una gran cantidad de energía proveniente principalmente de combustibles. Por otro lado, la aplicación desmedida de fertilizantes químicos es uno de los
20 factores que más negativamente influye en la degradación de los suelos, por lo que se hace indispensable la incorporación de fertilizantes más inocuos, para así reemplazar o disminuir el uso excesivo de fertilizantes químicos.

Los fertilizantes de mayor consumo a nivel mundial son productos químicos minerales que contienen principalmente Nitrógeno (N), fósforo (P) y
25 potasio (K). Estos productos son reconocidos como indispensables para proveer la cantidad de nutrientes necesaria para asegurar el rendimiento de los cultivos. Sin embargo existe una serie de factores asociados a los fertilizantes de síntesis química que actualmente son motivos de amplia discusión. Algunos de estos factores son: 1) la reducción de las reservas mundiales de roca fosfórica, 2) la

contaminación ambiental por la síntesis química de fertilizantes nitrogenados y fosfatados, 3) la contaminación ambiental por aplicación de fertilizantes al suelo, 4) La baja eficiencia de uso de los fertilizantes.

En relación al cálculo de la duración de las reservas de roca fosfórica, principal mineral utilizado para la síntesis de fertilizantes fosforados, este ha
5 presentado algunas variaciones durante los últimos años (Van Vuuren et al., 2010). Esto se debe a que los factores asociados a la disponibilidad de este recurso son prácticamente impredecibles. Entre estos factores podemos enumerar la demanda de fertilizantes fosforados, los diversos criterios técnicos
10 para estimar cuantitativamente las reservas de roca fosfórica, las nuevas políticas agrícolas, las crisis económica, inestabilidad geopolítica y distorsiones de Mercado (Cordell et al., 2011). En relación a las distorsiones de mercado podemos citar la crisis alimentaria del año 2008 en la que el precio de los commodities de roca fosfórica se incrementó en un 800% en un período de 18
15 meses. Así mismo, la mayoría de los estudios sobre las reservas de esta materia prima se basan en estimaciones que realiza cada país y en informes generados por evaluaciones científicas e industriales con diversos criterios técnicos (Jasinski, 2010). Un punto de inflexión relacionado con la disponibilidad de fertilizantes fosforados corresponde a lo que varios autores han denominado el
20 peak de producción de roca fosfórica (Dery y Anderson, 2007; Cordell et al., 2009; Cordell et al., 2011a), el cual se define como el momento en el que se produce la mayor cantidad de roca fosfórica de alta calidad y a un precio económico. Pasado este punto la producción de roca fosfórica disminuye, principalmente debido a limitaciones económicas y energéticas, independiente
25 de la creciente demanda del mercado (Cordell et al., 2011a). En general, los distintos estudios relacionados con el peak de producción de roca fosfórica sitúan este momento para los próximos 20 a 70 años (Cordell et al., 2009; Van Kauwenbergh, 2010; Lindström et al.; Cordell y White 2011). La vulnerabilidad del mercado mundial de la roca fosfórica hace indispensable diversificar las
30 fuentes P a través de la inversión en fertilizantes fosforados renovables y/o en

aumentar la eficiencia en la recuperación de todas las fuentes de P presentes en la cadena alimentaria.

Es reconocido a nivel mundial que la producción de fertilizantes consume mucha energía y emite importantes cantidades de gases de efecto invernadero.

- 5 A este respecto se ha calculado que la producción de fertilizantes consume el 1,2% del total de la energía mundial y que es responsable cerca del 1,2% de las emisiones de gases de efecto invernadero (Kongshaugh, 1988). En el caso de los fertilizantes nitrogenados, las principales emisiones de gases de efecto invernadero corresponden al CO₂, generado por la combustión gas natural para
10 la síntesis de amoníaco, y el óxido nitroso emitido durante la producción del ácido nítrico. La producción de fertilizantes fosfatados también emite grandes cantidades de CO₂ provenientes del consumo de combustibles fósiles utilizados en las distintas etapas del proceso de producción (Wood y Cowie, 2004).

- Los fertilizantes nitrogenados y potásicos en general presentan baja
15 concentración de As, Cd y Pb y, por lo tanto no contribuyen de manera significativa a la acumulación de elementos tóxicos en suelo y cultivos (Raven y Loeppert, 1997; Luo et al., 2009). En el caso de los fertilizantes fosfatados, estos presentan un amplio rango de concentración de metales pesados (As), dependiendo del tipo y la fuente del mineral del cual se extrae (Jiao et al.,
20 2012; Chaney, 2012). En general la roca fosfórica presente en rocas sedimentarias presenta mayor concentración de impurezas, entre ella elementos tóxicos, que los provenientes de las rocas ígneas (Hartley et al., 2012). Lamentablemente no se han desarrollado procesos económicos para la extracción de contaminantes presentes en la roca fosfórica (Stacey, 2010).
25 Algunos estudios en los que se evaluó la concentración de arsénico en más de 300 muestras de fertilizantes fosfatados, de distintos orígenes, demostraron que la concentración de arsénico es relativamente baja, presentando un promedio entre 7,6 a 20 mg kg⁻¹ de As en más del 90% de las muestras (Nziguheba y Smolders, 2008; Jiao et al., 2012). Sin embargo, considerando la
30 disminución de las fuentes de roca fosfórica de alta calidad, es muy probable que la tendencia sea ampliar el uso de rocas fosfóricas a yacimientos con alta

concentración de metales pesados (Stacey et al., 2010). Se ha demostrado que el uso a largo plazo de fertilizantes fosfatados con alta concentración de As incrementan considerablemente la concentración de As en el suelo, el cual es persistente en el tiempo y es absorbido por las plantas (Hartley et al., 2013). Al ser absorbido por las plantas e ingresar a la cadena alimentaria sin duda representa alto un riesgo para la salud humana, como podría ocurrir con la acumulación de As en el cultivo de arroz inundado (Meharg et al., 2009; Meharg y Zhao, 2012). En relación a otros elementos tóxicos en los fertilizantes fosfatados, el cadmio (Cd) y el plomo (Pb) se encuentran en concentraciones más variables que el As (Jiao et al., 2012). De hecho, en una evaluación de 277 muestras de fertilizantes 16% presentaron una concentración superior a 100 mg de Cd kg⁻¹, presentándose una tendencia similar en el caso del Pb (Jiao et al., 2012).

Por otro lado se ha observado que fertilizantes micronutrientes presentan mayor concentración de elementos tóxicos como Cd y Pb que los fertilizantes fosfatados y las mezclas de NPK (CDFA, 1998; EPA US 1999).

La eutroficación natural y antropogénica corresponde al enriquecimiento de las aguas superficiales con nutrientes estimulando así el crecimiento de la flora acuática. En general el nutriente más importante para el crecimiento de las algas es el P, dado que algunas especies de algas como las algas verde-azules pueden fijar biológicamente el N atmosférico (Chien et al., 2011). La principal fuente de P para la eutroficación del agua proviene de la agricultura (EPA, 2009), a través de la escorrentía del P disuelto en agua (Preedy et al., 2001). Al respecto, existen varios estudios en los se ha observado mayores pérdidas de P proveniente de fertilizantes fosfatados en comparación con las pérdidas provenientes de purines de ganadería (Bundy et al., 2001; Preedy et al., 2001; Tabara, 2003).

La máxima eficiencia de los fertilizantes aplicados directamente al suelo para fertilizantes nitrogenados, fosforados y potásicos es cercano a 55%, 35% y 60%, respectivamente. Así, por ejemplo, las pérdidas totales de N a nivel mundial pueden alcanzar 9.45 millones de Ton cada año. Para incrementar la

eficiencia de los fertilizantes se han diseñado los fertilizantes de liberación lenta, liberación controlada, inhibidores de la ureasa, inhibidores de la nitrificación, entre otros (Xiang et al., 2008). Sin embargo, estas tecnologías están enfocadas a disminuir las pérdidas de nutrientes, mientras que lo que en
5 realidad se necesita es que la liberación de nutrientes se asocie con los requerimientos de las plantas en sus distintas etapas de fenológicas.

En el suelo, la fracción orgánica de nutrientes es mayor que la fracción inorgánica. A este respecto, el N inorgánico corresponde a uno de los elementos más inestables en el suelo debido a que está sometido a distintos
10 procesos de pérdida como: 1) la lixiviación de NO_3^- , 2) la desnitrificación biológica con pérdidas de N como N_2 y N_2O ; desnitrificación química en las que el N se pierde como NO_x , N_2O_x y N_2 ; la volatilización con pérdidas de N en forma de NH_3 y; por erosión de suelo con pérdidas de N como NH_4^+ y N orgánico. Así, debido a las pérdidas de N del suelo no es posible acumular N en
15 la forma inorgánica. Por el contrario, la forma natural de acumulación de N en el suelo es a través de las formas orgánicas de N presentes en la materia orgánicas y/o en los residuos compostados. Una de las formas de N orgánico más abundantes en el suelo corresponde a los aminoácidos L-asparagina y L-glutamina. De hecho, algunos estudios han demostrado que el porcentaje de
20 NH_4^+ liberado durante la hidrólisis de la asparagina y la glutamina fue igual a la suma de éstos sustratos presentes en los ácidos húmicos (Bremner, 1955; Sowden, 1958). La mineralización de estos aminoácidos es catalizada por las enzimas L-asparaginasa y L-glutaminasa. Así, ambas enzimas juegan un importante rol en la Mineralización de N del suelo y por lo tanto en el aporte de
25 N para las plantas (Hojjati y Nourbakhsh, 2007; Nourbakhsh y Alinejadian, 2009).

Similar al N, el azufre orgánico del suelo comprende entre 98-99% del azufre total (Tabatabai, 1982). Del total de S orgánico (500 a 1500 mg S Kg^{-1} suelo) contenido en el perfil del suelo y en residuos orgánicos, la forma de éster sulfato ($\text{R-O-SO}_3\text{H}$), equivale a un 30-75% (Aguilera et al., 2002). El éster sulfato es considerado la forma de azufre más lábil del suelo y por lo tanto la
30

que se relaciona directamente con la nutrición de las plantas (Maynard et al., 1985; Eriksen et al., 1998). Entre las enzimas relacionadas con la transformación del azufre desde polímeros orgánicos, las enzimas arilsulfatasas son consideradas claves para la mineralización del éster sulfato, y por lo tanto
5 son responsables de la movilización del azufre desde la materia orgánica o desde los sustratos orgánicos como el compost (Klose y Tabatabai, 1999).

En la mayoría de los suelos el fósforo (P) orgánico representa entre el 20 al 80% del P total, por lo que constituye una importante reserva potencialmente disponible (Fransson y Jones 2007). La mayoría del P orgánico
10 está constituido por las formas monoéster y diéster fosfato (Borie y Rubio, 2003; Briceño et al., 2005; Turner 2008). Ambas formas orgánicas de P son mineralizadas por enzimas fosfatasas ácidas y alcalinas, las que generan como producto fosfato, el cual puede ser rápidamente absorbido por las plantas (Sanyal y DeDatta, 1991). Las fosfatasas son muy sensibles a la deficiencia de
15 fósforo en el suelo, por lo que se produce un fuerte incremento de la fosfatasa cuando se genera una disminución de P en la solución de suelo (Sedenko y Zaitseva, 1984; Smith y Chevalier 1984).

Los estudios relacionados con la adición de enzimas al suelo para acelerar los procesos de mineralización no son nuevos. Uno de los primeros
20 estudios realizados por Neumann et al. (1999) indicaron que la adición de la enzima fosfatasa ácida al suelo, para acelerar los procesos de mineralización de P orgánico, generó una baja liberación de P desde la fracción orgánica, debido a que la enzima disminuyó fuertemente su actividad por desnaturalización. Por lo tanto, la estrategia de uso de enzimas para la mineralización acelerada de
25 nutrientes orgánicos solo será efectiva si la enzima se encuentra activa e inmovilizada en algún soporte. De hecho, se ha demostrado que naturalmente, al adicionar cualquier enzima al suelo, esta queda retenida ó inmovilizada durante los primeros 3 minutos de entrar en contacto con las distintas fracciones de suelo, aunque esto no asegura que la enzima este activa. A este
30 respecto se han realizado algunos estudios de inmovilización artificial de fosfatasa ácida y arilsulfatasa sobre soportes como sustancias húmicas, arcillas

2:1 y óxidos de Al y Mn. Como resultado la actividad de las enzimas disminuyó debido a que algunos soportes actuaron como inhibidores enzimáticos o perdían proteína durante el proceso de inmovilización artificial de las enzimas (Rao y Gianfreda, 2000; Kelleher et al., 2004; Whalen y Warman, 1996b). Así, el control de la mineralización de sustrato orgánicos a través de enzimas requiere de la selección de soportes que puedan retener una alta concentración de proteína y, además, que dichos soportes no inhiban la actividad de la enzima. De acuerdo a los resultados obtenidos por Rosas et al. (2008) y López y Rosas (2008), la inmovilización de la fosfatasa ácida en minerales de arcilla proveniente de un Andisol incrementó la actividad específica de la enzima entre un 89-144%. Además, el proceso de inmovilización en este soporte no evidenció pérdidas de proteínas, lo cual es común cuando se utilizan otros tipos de soportes ya sean estos orgánicos o inorgánicos (Rao y Gianfreda, 2000). Inicialmente el proceso de mineralización de P de la fosfatasa ácida fue estudiado por Pant y Warman (2000), quienes determinaron que la adición al suelo de una fosfatasa inmovilizada incrementó en un 49% el fósforo disponible (extractado con agua y NaOH). A este respecto, López y Rosas (2008) informaron de un incremento en el P disponible (P-Olsen) de hasta un 150% por la inmovilización de la fosfatasa ácida en arcillas de Andisoles, utilizando niveles de proteína enzimática muy bajos.

La mayoría de los agricultores reconoce la importancia de la aplicación de compost al suelo debido al aporte de nutrientes y al efecto sobre las propiedades físicas del suelo. Sin embargo, la disponibilidad de nutrientes desde el compost es dependiente del procesos de mineralización. Por lo que a semejanza de los fertilizantes minerales la liberación de nutrientes del compost no coincide con la absorción de las plantas. La mineralización de la materia orgánica en el suelo es llevada a cabo por enzimas del ciclo del N, P y S. Sin embargo, debido a la degradación de los suelos y el uso de especies vegetales con menor grado de adaptación que la flora nativa, se ha generado una sucesiva pérdida de actividad enzimática en los suelos. El uso de enzimas

inmovilizadas podría permitir una forma más eficiente y amigable con el medio ambiente para producir nutrientes para la producción agropecuaria.

En los últimos años, los estudios de inmovilización enzimática en nanopartículas de sílica han tenido un fuerte desarrollo debido a que la inmovilización en estos soportes incrementa la actividad y eficiencia catalítica de las enzimas (Gill, 2001; Reetz et al., 2003; Shchipunov et al., 2004). Wei et al. (2001) inmovilizaron una fosfatasa ácida en nanoporos de sílica. En este soporte la actividad y la eficiencia catalítica de la enzima se incrementaron debido a que el tamaño de poros y el área superficial del soporte facilitaron el transporte del sustrato y el producto. Luckarift et al. (2004) demostraron que las enzimas inmovilizadas en una matriz de sílica presentaron una alta estabilidad térmica y ausencia de degradación proteolítica, luego de permanecer 30 días a temperatura ambiente y en ausencia de antibióticos (Luckarift et al., 2004). Estos nanomateriales de sílica presentan partículas y poros de tamaño y estructura similares a los microagregados de alofán. El alofán es el constituyente principal de los minerales de arcilla de los Andisoles. Esta arcilla se caracteriza por presentar una área superficial que varía entre 700 a 1100 m²/g y un tamaño aproximado de 35 a 55 Å (Parfitt, 1990). El alofán es considerado como una nanopartícula natural debido a su tamaño, gran área superficial, tamaño de poros y estabilidad estructural (nanoarcilla).

La adición de enzimas inmovilizadas, en comparación con la fertilización tradicional, presenta claras ventajas, entre ellas; 1) la fertilización tradicional de P genera una alta disponibilidad de P inicial, la cual constituye una de las principales causas de la eutrofización de agua, 2) la enzima se activa en condiciones de baja disponibilidad de nutrientes, la cual es generada por la absorción natural de las plantas, y se inactiva cuando la disponibilidad alcanza niveles medios (15 -20 mg kg⁻¹; Lopez y Rosas, 2008), 4) la enzima inmovilizada puede permanecer activa por mucho tiempo y contribuir a la disponibilidad natural de nutrientes para más de un cultivo.

El compostaje es un proceso bio-oxidativo (Albrecht et al. 2010), en el que restos orgánicos de distintos orígenes (paja, cascarillas, cortezas,

subproductos de la agroindustria, y estiércol, entre otros) se modifican por la descomposición y humificación a través de una amplia variedad de procesos biológicos y bioquímicos (Tiquia et al., 2001). De esta transformación se obtiene un producto relativamente estable, libre de fitotoxicidad y patógenos y
5 con alto contenido de sustancias húmicas (Zucconi y De Bertoldi, 1987; Claassen y Carey, 2004). Las enzimas desempeñan un rol fundamental en estas transformaciones (Tiquia et al., 2001; Tiquia et al. 2002), ya que proporcionan nutrientes fácilmente asimilables a los diferentes microorganismos presentes en cada etapa del compostaje. Entre estas enzimas, se encuentran las que podrían
10 tener importantes aplicaciones en el área agrícola, como las fosfatasas, arilsulfatasas y enzimas del ciclo del N.

El compostaje, tal como indican Gautam et al. (2010), es considerado un proceso que permite reciclar los residuos orgánicos y producir materia orgánica que es apta para ser aplicada al suelo reduciendo el impacto medioambiental de los residuos. En estudios realizados por Vuorinen (2000), Mondini et al.
15 (2004) y Fuentes (2009), se observaron actividades de fosfatasa ácida y alcalina que son mayores que las presentes en suelos sometidos a uso agrícola o incluso que las observadas en un ecosistema de bosque prístino en el Sur de Chile, en un Andisol.

Godden et al. (1983), Vuorinen (2000) y Fuentes (2009) observaron que la actividad de fosfatasa aumentó durante los primeros días de compostaje de estiércol bovino, y se mantuvo constante durante la etapa termófila. Respecto al tiempo en que se genera la mayor actividad fosfatasa, Albrecht et al. (2010) quienes realizaron un compostaje de residuos verdes y lodos de aguas
20 residuales describe que la actividad fosfatasa presenta un comportamiento cíclico, alcanzándose primero el peak de fosfatasa ácida y luego la de fosfatasa alcalina. Por lo tanto, la producción de enzimas es dependiente de cada etapa del compostaje.

Inspirada en el proceso de compostaje se ha genera una técnica
30 denominada fermentación en estado sólido (FES), la que se define como un proceso de fermentación ocurrido en ausencia de un flujo de agua libre,

empleando como soporte sólido sustratos naturales o sintéticos para el crecimiento microbiano (Pandey et al., 2009). Esta técnica permite generar condiciones específicas para la producción de determinada biomolécula, conservando las ventajas del proceso original de compostaje como, bajo
5 requerimiento de energía, uso de sustratos fermentables de bajo costo, los que además proveen fuentes de carbono, nitrógeno, macro y micro elementos, necesarios para el crecimiento de microorganismos (Petruccioli et al. 2011) y, contribuir con la eliminación de los residuos sólidos (Pandey, 2000). De hecho, FES es la técnica de producción de enzimas cada día más utilizada en
10 aplicaciones industriales (Rodríguez y Sanromán, 2005).

Otro de los factores clave en la actividad enzimática es la temperatura durante la FES. De hecho, está descrito que la actividad enzimática durante el proceso de compostaje es dependiente de la temperatura (Mondini et al., 2004).

15 La humedad parece ser otro factor relevante en la FES. De acuerdo a Manpreet et al. (2005) el rango adecuado para este tipo de fermentación fluctúa entre 40 y 80%. Por lo tanto, para optimizar la producción de enzimas en una fermentación, es necesario considerar condiciones de temperatura y humedad.

20 En contraste a las actividades de fosfatasa ácida, observadas en ecosistemas naturales como bosques del sur de Chile, en suelos Andisoles, cuyos valores alcanzan 1 UI g^{-1} de suelo seco (Redel et al. 2008) y a las actividades reportadas durante el proceso de compostaje, donde alcanzan valores desde 0,3 a $3,4 \text{ UI g}^{-1}$ (Vuorinen, 2000; Tiquia et al., 2001; Pandey,
25 2003), se puede inferir que el estiércol de bovino podría ser aprovechado como materia prima para la producción de enzimas y que la máxima actividad fosfatasa se podría obtener realizando la FES de estiércol de bovino, inspirada en el proceso de compostaje, a una temperatura de 35°C , correspondiente a la etapa mesófila-termófila.

DIVULGACIÓN DE LA INVENCION

La invención consiste en un proceso para producir un biofertilizante en base a enzimas inmovilizadas en un nanomaterial, lo que permite incrementar la disponibilidad del nutriente cuando la planta lo requiera.

El proceso consta de una primera etapa donde se realiza una fermentación en estado sólido bajo condiciones necesarias para producir enzimas clave para la nutrición de plantas. En esta fermentación también se producen los sustratos necesarios para que las enzimas catalicen las reacciones de mineralización necesarias para suplir los requerimientos de P, N, S y otros elementos necesarios para las plantas. En una segunda etapa del proceso, al fermentado resultante se le adiciona un nanomaterial denominado alofan, que consiste en nanopartículas de Si y Al, que forman agregados donde se inmovilizan las enzimas producidas durante la FES, quedando protegidas de la degradación microbiana y aumentando su eficiencia catalítica. En una tercera etapa, se realiza una nueva fermentación con las condiciones necesarias para reducir el número de microorganismos patógenos que hayan sobrevivido en la primera etapa, mejorando así la calidad del fermentado. Como resultado de estos procesos se obtiene un fermentado enriquecido en enzimas, sustratos orgánicos, hormonas del crecimiento vegetal, macronutrientes y micronutrientes minerales necesarios para el desarrollo de las plantas.

La primera etapa comienza a partir de residuos agropecuarios y de la agroindustria, que son sometidos a una fermentación en estado sólido, la que puede ocurrir tanto en reactores como en pilas. La fermentación tiene como parámetros una temperatura entre 25°C a 70°C, y una humedad entre el 55 a 80%. Esta etapa dura entre 12 a 18 días cuando se realiza en reactores y entre 5 a 10 semanas cuando se realiza en pilas, con lo que se promueve la producción de enzimas como fosfatasa, sulfatasa, asparaginasa, y glutaminasa; además de sustratos orgánicos y microorganismos beneficiosos. Debido a que en esta etapa también se multiplican microorganismos patógenos,

principalmente relacionados con enfermedades gastrointestinales, como son *E. coli* y *Salmonella sp.* es necesario una segunda FES en la etapa final del proceso.

La diferencia en tiempo de esta FES depende de si la fermentación se realiza en reactores o en pilas. En reactores se ve una tendencia cíclica de aumento y disminución de actividad si se prolongan los tiempos, por tal motivo es conveniente una fermentación más acotada. Por el contrario cuando se realiza la fermentación en pilas aun después de 3 meses de FES pasando por temperaturas de 70° C, la actividad es cercana a la obtenida en los primeros máximos proveniente de los reactores.

Al culminar la primera etapa se adicionan las nanopartículas, correspondiente a alofan en un porcentaje entre el 10 al 40% peso/peso (materia seca de fermentado vs materia seca de alofan). Esta etapa permite encapsular las enzimas y parte de los sustratos anteriormente generados. Al formular un biofertilizante un objetivo clave es que se convierta en un biocatalizador eficaz, para lo cual, es importante la inmovilización de las enzimas que contiene. En este respecto, las nanopartículas tienen la relación área superficial/volumen idónea para servir de portador enzimático. El alofan es una nanopartícula o nanoarcilla que entrega un muy buen nivel de inmovilización enzimática, está formado por esférulas de diámetro entre 3 a 8 nm, que forman agregados porosos que permitirían la interacción con la materia orgánica y la protección física de las enzimas en esta.

En una tercera etapa se realiza una nueva FES de una duración más prolongada, entre 30 a 60 días, a una temperatura entre 15 y 50°C y con una humedad de entre el 60 y 85%. Lo que favorece el desarrollo de procesos que producen metabolitos que controlan las bacterias patógenas dando como resultado la eliminación de estas.

Como producto final de este proceso se obtiene un biofertilizante que contiene:

- a) enzimas encapsuladas, principalmente fosfatasas, sulfatasas, asparaginasas, y glutaminasas;
- b) sustratos orgánicos que contienen P, N y S;

- c) compuestos orgánicos beneficiosos para el crecimiento de las plantas como hormonas, ácidos fúlvicos, y ácidos húmicos;
- d) microorganismos beneficiosos para el desarrollo de las plantas

- 5 El biofertilizante comprende una concentración de materia orgánica entre un 55 a un 70%, alofan 10 - 40% y una concentración de enzimas encapsulas en el alofan, correspondiente a $1.09 - 4,4 \text{ UIg}^{-1}$ para Fosfatasa alcalina; $0,2 - 1,2 \text{ UIg}^{-1}$ para Fosfatasa acida; $0,05 - 0,10 \text{ UIg}^{-1}$ para Arilsulfatasa; $0,6 - 1,05 \text{ UIg}^{-1}$ para L-Asparaginasa; y $3,0 - 4,6 \text{ UIg}^{-1}$ para L-Glutaminasa.
- 10 Este biofertilizante posee un pool de nutrientes almacenados en forma orgánica que se liberarán por acción de las enzimas durante el desarrollo de la planta dependiendo de la concentración de nutrientes en el suelo, estos están caracterizados según tabla 1.

15 Tabla 1: Nutrientes disponibles en el biofertilizante.

Materia Orgánica	64,37 %
Nitratos (N-NO ₃)	55,80 mg/kg
Amonio (N-NH ₄)	404,70 mg/kg
Nitrógeno disponible	460,40 mg/kg
Fosforo (P)	0,78 %
Potasio (K)	1,20 %
Calcio (Ca)	3,08 %
Magnesio (Mg)	0,30 %
Fierro (Fe)	5600 ppm
Manganeso (Mn)	580 ppm
Zinc (Zn)	360 ppm
Cobre (Cu)	80 ppm
Boro (B)	62,27 mg/kg
N-Total	3,08 %
Na	0,51 %

- Este biofertilizante genera un rendimiento similar o superior a los fertilizantes químicos pero con una mayor eficiencia y sustentabilidad ya que permite revalorizar residuos y evita las perdidas de nutrientes hacia el medio ambiente ya que aporta sólo la cantidad necesaria de nutrientes a la planta y en forma sincronizada con sus requerimientos.
- 20

- A diferencia de los compost que aportan principalmente sustratos orgánicos, sustancias fúlvicas y húmicas al suelo, el biofertilizante además, aporta enzimas, lo cual le permite liberar nutrientes desde los sustratos orgánicos en cantidades suficientes para el desarrollo de la planta. Como ejemplo, la etapa 1 del proceso de producción del biofertilizante, que consiste en las fermentaciones para producir las enzimas, se pueden producir grandes cantidades de éstas (Tabla 2), mientras que en los compost comerciales no se han detectado cantidades significativas de ninguna de estas enzimas.

10 Tabla 2: cantidad de enzimas producidas en el fermentado.

Producción Enzima UI/Ton de m.s de Fermentado	
Arilsulfatasa	100.000
Fosfatasa ácida	600.000
Fosfatasa alcalina	4.000.000
L-asparaginasa	800.000
L-glutaminasa	2.000.000

- En síntesis, el nuevo biofertilizante tiene en una sola formulación las ventajas de los fertilizantes minerales de liberación controlada, que aportan nutrientes disponibles a la planta en forma gradual en el tiempo, y de los compost, que aportan sustratos orgánicos, sustancias húmicas y microorganismo beneficiosos al suelo.

EJEMPLOS DE APLICACIÓN

20 Ejemplo 1: Proceso de producción del biofertilizante.-

El estiércol usado en los ensayos de FES en reactores fue recolectado de un galpón de engorda de novillos en Agrícola Pullami en Coihueco.

Este proceso consta de 3 etapas, estas se describen a continuación:

I. Fermentación en estado sólido de estiércol para producir enzimas.

Se evaluó la actividad enzimática durante la fermentación en estado sólido (FES) de estiércol de bovino bajo diferentes condiciones de temperatura y humedad para optimizar el proceso de producción de enzimas.

Se evaluó el efecto de la temperatura sobre la actividad de las enzimas durante la fermentación en estado sólido de estiércol de bovino, efectuándose pruebas a 25°C, 35°C y 55°C.

El diseño de los reactores para el proceso de fermentación en estado sólido se realizó de acuerdo a una adaptación de la metodología propuesta por Grewal et al. (2006). El sistema permite tener condiciones controladas de temperatura y humedad, el primer ensayo se realizó con una temperatura de 25°C y los purines sin secar, es decir, con una humedad superior a 80%, en un segundo ensayo se utilizó una temperatura de 35°C y una humedad de 60%, y finalmente se realizó un ensayo a 55°C y 60% de humedad.

En la figura 1 se muestra la disposición de los equipos para el proceso de fermentación, en una incubadora (6) se dispuso un reactor (5), que consistió en un tubo cilíndrico de PVC de 16 cm de diámetro y 30 cm de largo, con una capacidad de 4 L aproximadamente; la base del cilindro llevaba una malla metálica de 1 x 1 mm de abertura con el fin de homogeneizar el aire a difundir. El soporte de estas mallas fue un disco de acrílico. Para lograr un proceso de fermentación aerobia, los reactores se conectaron a una línea de aire (3); el aire lo aportó un sistema de aireación externo, alimentado por un compresor de 2 HP (1). Este aire fue tratado, primero por una trampa de vapor; posteriormente por un filtro de aire que tuvo por función minimizar el contenido de aceite proveniente del motor del compresor. Esto permitió que el aire estuviera libre de partículas que pudieron haber alterado el proceso biológico y/o determinación de la actividad enzimática. Un rotámetro (2) reguló el flujo

de aire, el cual se ajustó a 100 ml/min. La línea de aire fue conectada, por medio de una cañería, a un frasco de vidrio con agua destilada (4), donde se producía el burbujeo permitiendo mantener una humedad estable en los bioreactores. Para registrar la temperatura se utilizó un Data Logger (7) que
5 funcionó como un scanner con entradas de sensores de temperaturas (termocuplas) que iban conectados a un computador (8).

Cada siete días se realizó un volteo del estiércol en cada reactor, este consistió en revolver el estiércol con el fin de homogeneizarlo, inmediatamente después del volteo, se tomó una muestra de 50 g por cada reactor. Estas
10 muestras fueron utilizadas para determinar los parámetros físicos, químicos y bioquímicos.

Un primer ensayo de fermentación utilizó estiércol fresco, tal como proviene del galpón de engorda animal, el cual presenta una humedad de 80% y se fermentó a una temperatura de 25°C para simular la temperatura
15 medioambiental de la época de primavera, con tres repeticiones.

En un segundo ensayo de FES en que el estiércol bovino fue acondicionado a fin de alcanzar una humedad del 60%, se evaluó el efecto de la temperatura sobre la actividad enzimática. Se evaluó el efecto de dos temperaturas, 35°C y 55°C, correspondientes a los promedios de las
20 temperaturas alcanzadas en las etapas mesófila y termófila, respectivamente, del proceso de compostaje. Se evaluó la actividad hasta que se observó un comportamiento repetitivo en el tiempo, con ciclos de aumento y disminución de la actividad. Esta evaluación se realizó en el transcurso de 10 semanas.

Actividad fosfatasa ácida y alcalina: Las actividades enzimática se
25 determinaron de acuerdo a una adaptación de la metodología propuesta por Vuorinen (1993, 2000), la cual consistió en pesar 0,25 g de muestra y mezclar con 1,25 ml de sustrato 4-nitrofenil fosfato 62,3 mM en buffer MUB a pH 5,0 para determinar actividad fosfatasa ácida, y pH 9.0 para determinar la actividad fosfatasa alcalina. Luego se incubó la enzima con el sustrato a 30° C durante 30
30 minutos. Posteriormente la mezcla se enfrió rápidamente en un baño de hielo y se le agregó 3 ml de dietil eter, previamente enfriado. Se agitó durante 60

minutos en un agitador refrigerado a 4° C. Después de la agitación, se extrajo 0,5 ml de la solución resultante y, para la fosfatasa ácida, se agregó 4,5 ml de una solución de NaOH 0,5 M en un frasco de 10 ml. Para la fosfatasa alcalina se disolvió 1 ml de la solución que ya contenía 4,5 ml de NaOH 0,5 M en 2 ml de agua destilada y se agitó vigorosamente. Al extracto obtenido en el proceso anterior se midió la absorbancia a 420 nm con un espectrofotómetro. Se realizó una curva de calibración, para poder calcular la concentración de producto de la reacción (p-nitrofenol) en la muestra. La actividad se expresa como UI g⁻¹ de fermentado seco (unidades internacionales en función de la materia seca del fermentado).

Las curvas de actividad de ambas enzimas a las diferentes temperaturas de los reactores, se muestran en la figura 2 para fosfatasa alcalina y en la figura 3 para fosfatasa ácida.

En la FES a 25° C y 80% de humedad, la mayor actividad de la enzima fosfatasa alcalina se alcanzó en la novena semana del ensayo, con un valor de 3,40 UI g⁻¹ de fermentado seco, seguida por la cuarta semana con un valor de 3,36 UI g⁻¹ de fermentado seco según se observa en la figura 2. La mayor actividad de la enzima fosfatasa ácida se alcanzó en la séptima semana del ensayo, con un valor de 1,02 UI g⁻¹ de fermentado seco, seguida por la quinta semana con un valor de 0,98 UI g⁻¹ de fermentado seco y 0,93 UI g⁻¹ de fermentado seco en la sexta semana según se observa en la figura 3.

Para la fosfatasa alcalina, los valores obtenidos en el ensayo a 25° C y 80% de humedad fueron mayores a los esperados, considerando que en estudios similares, la mayor actividad enzimática de enzimas hidrolasas, está asociada a mayor temperatura y se dan naturalmente en el proceso de compostaje (Vuorinen, 2000; Mondini et al., 2004). En relación a la fosfatasa ácida, al igual que en los resultados obtenidos para fosfatasa alcalina, existe un comportamiento cíclico de la actividad enzimática durante la FES donde se aprecian altos valores de actividad fosfatasa ácida en la semana 7, 5 y 6.

En la Fes realizada a 60 % de humedad, la evolución temporal de los tratamientos a 35°C y 55°C se caracterizó por un marcado aumento de la

actividad enzimática fosfatasa alcalina en la tercera semana del ensayo, con valores de 4,39 UI g⁻¹ de fermentado seco y 2,44 UI g⁻¹ de fermentado seco, respectivamente. Por su parte, la actividad de la fosfatasa ácida tuvo un aumento en las semanas 5 y 9 del ensayo, con valores de 1,22 UI g⁻¹ de fermentado seco a 35°C y 0,24 UI g⁻¹ de fermentado seco a 55°C, siendo inferiores a los valores obtenidos a 35° C

Actividad arilsulfatasa: Se utilizó una adaptación de la metodología desarrollada para determinar actividad enzimática descrita por González *et al.* (2003) y Fornasier *et al.* (2002), consistente en utilizar la capacidad hidrolítica de la enzima sobre un sustrato artificial: *p*-nitrofenil sulfato (*p*NPS) para detectar el producto resultante (*p*-nitrofenol, *p*NP) por espectrofotometría a 420 nm. La cuantía de esta actividad enzimática es proporcional a la concentración del *p*NP presente en el medio al final de la hidrólisis. Se pesó 0,25 g de fermentado en un recipiente de vidrio, se añadió 5 ml de Buffer acetato a pH 5,7 y 1,25 ml de *p*NPS 5mM en buffer y se incubó durante 1 hora a 37 °C. Finalizada la incubación se enfrió a 4°C y se añadió 3 ml de dietileter llevándolo a agitación a 200 rpm por 1 hr. Se tomó 0,5 ml del sobrenadante con 2,5 ml de NaOH 1 M y se determinó la absorbancia a 420 nm. La cuantificación de la actividad enzimática en la muestra se determinó por comparación con una curva realizada a partir de la solución patrón (fermentado sin sustrato).

Como se observa en la gráfica de la figura 4, una alta actividad enzimática Arilsulfatasa se registra en la semana 5 del ensayo a 25° C y 80 % de humedad, con un valor igual a 0,1094 UI/g fermentado seco, en tanto que en la semana 1 se observa la menor actividad enzimática de este ensayo, con un valor de 0,0569 UI/g fermentado seco. La mayor actividad arilsulfatasa del ensayo realizado con una humedad de 60 % y a una temperatura de 35°C fue alcanzada en la semana 2, con un valor igual a 0,1038 UI/g de fermentado seco, mientras que el menor valor de actividad se observó en la semana 5 con un valor igual a 0,0058 UI/g de fermentado seco a una temperatura de 55°C.

Los estudios en actividad arilsulfatasa son particularmente escasos en procesos de compostaje o fermentaciones (Cayuela *et al.* 2008). Tejeda *et al.* (2009) detectaron una actividad enzimática arilsulfatasa máxima de 0,0078

UI/g, en la segunda semana del proceso de compostaje con temperaturas cercanas a las de la etapa mesófila del proceso de compostaje y con un 52,8% de humedad, valor muy inferior a los obtenidos en el presente estudio. De modo similar, en un estudio en compostaje realizado por Cayuela et al. (2007) en residuos de almazaras de olivas, se describe un máximo de actividad arilsulfatasa de 0,0156 UI/g a las 34 semanas, correspondiente al final del proceso de compostaje en el que se mantuvo la humedad entre 40 y 60%. Por su parte, Mondini et al. (2004), observaron valores máximos de actividad arilsulfatasa de 0,0335 UI/g a los 85 días en residuos de jardín y de algodón. Sin embargo, en todos estos estudios el objetivo era caracterizar el compost estabilizado o maduro luego del proceso de degradación, mientras que este estudio se realizó sobre una FES propiamente tal, con elevada humedad, temperaturas constantes y tiempos menores.

Actividad L-asparaginasa y L-glutaminasa: La metodología se basa en dos procedimientos, el primero descrito por Frankenberger y Tabatai (1991a, 1991b) y Keeney y Nelson (1982) para la etapa de reacción enzima/sustrato; y el segundo, corresponde al uso del equipo "ion selectivo de amonio" con membrana de gas, cuyo principio se basa en la transformación de los iones de amonio a amoniaco en una solución de pH mayor a 11. Se mezcló 0,5 gr de fermentado con 10 ml buffer Tris pH 10 y 1ml de sustrato (L- asparagina 0,5 mol/L o L-glutamina 0,5 mol/L). Se utilizó como control 0,5 g de fermentado con 9 ml buffer Tris pH 10 y 1 ml de sustrato al que se adicionó 35 ml de Ag_2SO_4 -KCl antes del proceso de incubación. Para el blanco se utilizó la misma mezcla que para las muestras y control, pero no se adicionó el sustrato. Todas las muestras, con sus respectivos blanco y control, se incubaron por 2 horas a 37 °C. Al término del período de incubación y al igual como se procedió con el control, se agregó 35 ml de Ag_2SO_4 -KCl a las muestras con el fin de detener la reacción. Posteriormente, las muestras fueron filtradas y el NH_3 se destiló por arrastre de vapor, para ser atrapado en ácido bórico (Sadzawka *et al.*, 2005). Una vez destiladas las distintas muestras, se titularon con ácido sulfúrico (H_2SO_4) 0,005 M. La cantidad de ácido sulfúrico gastado es proporcional a la

concentración de amonio y representa la liberación de producto generado por la enzima.

La actividad de la enzima L-asparaginasa alcanza valores mayores bajo la condición de fermentación a 25° C y 80 % de humedad, en comparación a las otras condiciones ensayadas, donde alcanzó en la novena semana del ensayo, un valor de 1,03 UI g⁻¹ de fermentado seco, mientras que al ser fermentado el estiércol a 35° C y 55° C con un 60 % de humedad, las mejores actividades se registraron a la séptima y sexta semana respectivamente, registrándose un importante aumento en la actividad de la enzima a 55° C a partir de la sexta semana, como se ven en la figura 5. La escasa diferencia entre la máxima actividad alcanzada a 25° C y 55° C concuerda con el amplio rango de temperatura en el cual funciona la enzima descrito por El-Bessoumy et al. (2004), quienes publican que, si bien el máximo de actividad para la L-asparaginasa se conseguía con 37° C, a 50° C la actividad se mantenía al 52%.

La actividad de la L-glutaminasa se destaca por tener los más altos registros frente a las demás enzimas ensayadas. Bajo la condición de fermentación a 25° C alcanzó las 4,6 UI g⁻¹ de fermentado seco en la quinta y décima semana, mientras que a 35° C y 55° C la más alta actividad se consiguió a 35° C durante las primeras 5 semanas de fermentación, pero con valores más bajos que los alcanzados en la primera condición (figura 6).

Estos resultados determinan las condiciones óptimas que debe tener una fermentación para la obtención de un determinado preparado que entregue la enzima requerida de acuerdo a las necesidades particulares de un suelo. En el caso, por ejemplo, de un biofertilizante con alta actividad de la enzima fosfatasa alcalina, este puede ser obtenido en tres semanas fermentando estiércol a una temperatura de 35° C y con 60% de humedad. Por otro lado, si lo que se quiere conseguir es un preparado con alta actividad de la enzima L-glutaminasa, la fermentación debe realizarse a 25° C, 80% de humedad y en no más de cinco semanas. De modo que es posible obtener actividad enzimática a partir de un sustrato económico y abundante como lo es el estiércol, además de no ser necesario siempre acondicionar el estiércol.

- Fermentación en estado sólido en pilas: las pilas de estiércol bovino para la producción de enzimas, tienen una medida mínima de 1m^3 y en este caso se utilizó 2 pilas de dimensiones $3 \times 2,5 \times 1$ m de largo, alto y ancho respectivamente, en las que se evaluaron dos configuraciones de FES. En el
- 5 primero, se utiliza un aislante térmico fabricado con malla raschel negra (polietileno) y relleno con paja de trigo, mientras que en el segundo, la pila permanece descubierta al aire. Además de registrar actividad enzimática en muestras obtenidas directamente de las pilas al terminar la FES, se evaluó también el almacenamiento en condiciones de temperatura ambiente y a 4°C .
- 10 El estiércol se obtuvo de corrales de vacas lecheras de la estación Experimental Human del Instituto de Investigaciones agropecuarias, ubicada en la zona de Los Angeles. Se acumuló aproximadamente 2 toneladas durante tres días en un sector bajo techo, luego fue transportado hasta la Estación Experimental El Nogal de la Facultad de Agronomía de Universidad de
- 15 Concepción, donde fue esparcido sobre una superficie de polietileno para facilitar el secado y obtener un material con 60% de humedad. Se dispuso, en primera instancia, 2 pilas de dimensiones $3 \times 2,5 \times 1$ m de largo, alto y ancho respectivamente, cubriendo una de ellas con la malla. Se realizó labores de volteo 4 veces al día para controlar temperatura, regando con la misma
- 20 frecuencia para mantener la humedad al 60%. Transcurridos 9 días, se hicieron 4 pilas a partir de las dos pilas iniciales, en las que se generaron las condiciones para la FES. Luego de 30 días de FES se ensacó el material (tabla 3).

Tabla 3. Resumen de muestreos durante la FES.

Descripción	Días desde Inicio de la FES
Primer muestreo para actividad enzimática desde pilas de FES	40
Almacenamiento de sacos a 4°C y temperatura ambiente	58
Segundo muestreo para actividad enzimática desde sacos almacenados	58

En la figura 7, se muestra la actividad de las diferentes enzimas (fosfatasa alcalina (a); fosfatasa acida (b); arilsulfatasa (c)) al terminar la fermentación en estado sólido bajo cubierta aislante térmica comparada con la actividad en fermentación sin cubierta aislante, donde existe una tendencia a una mejor actividad en la pila con cubierta. En la figura 8 se describen las actividades de las diferentes enzimas (fosfatasa alcalina (a); fosfatasa acida (b); arilsulfatasa (c)) en el fermentado bajo cubierta aislante (negro) y sin cubierta aislante (gris), ambos almacenados durante 37 días. Las condiciones de almacenamiento corresponden a: 1) el producto almacenado en sacos a 4°C y, 2) el producto almacenado en sacos a temperatura ambiente. Los resultados demostraron que el almacenaje a 4°C del fermentado producido bajo cubierta presenta una actividad significativamente mayor al fermentado en otras condiciones. En condiciones de almacenamiento en bodega la actividad de las enzimas decae principalmente debido a la pérdida de humedad del fermentado, esto puede ser revertido al humedecer nuevamente el producto según lo observado en la figura 9

II. Adición de alofan a un fermentado de estiércol para la obtención de un biofertilizante

El alofan utilizado para este ensayo corresponde a esferulas de 5 nm de diámetro.

Este ensayo persigue optimizar el proceso de inmovilización de enzimas y el uso de alofan, determinando la proporción alofan/estiércol que logre la mayor actividad enzimática, así como el momento oportuno para adicionar el alofan y conseguir la inmovilización de las enzimas.

El estiércol utilizado corresponde al colectado en corrales de novillos de engorda, este fue almacenado en un galpón durante al menos un mes. Posteriormente, fue secado y se pre-acondicionó, humedeciéndolo y picándolo en una chipeadora. Finalmente fue almacenado a temperatura ambiente durante dos semanas. Antes de comenzar el ensayo, el estiércol fue acondicionado a 60% de humedad.

El ensayo consta de 2 tratamientos y 3 réplicas para cada uno de ellos. Todos los tratamientos fueron fermentados durante 16 días a 35°C y 65% de humedad, a excepción del tratamiento 1, que corresponde al estiércol sin fermentar. Para realizar la fermentación se utilizó una cámara de incubación, con variables controladas. A cada unidad experimental se adicionó una proporción de alofan, la que correspondió a 15 o 30% de material seco al final de la fermentación (a los 16 días). El testigo corresponde al estiércol fermentado sin adición de alofán.

Las condiciones que se analizaron se muestran en la tabla 4, donde el contenido de alofan corresponde a 11% HBH, hay que considerar que las tres proporciones utilizadas, tienen diferentes concentraciones de enzima, ya que es el estiércol el que aporta las enzimas.

Tabla 4: Diferentes condiciones experimentales en ensayo.

Relación Alofán/ estiércol	Adición alofán (días)	Estiércol (gr sólido seco)	Alofán (gr sólido seco)
0 / 100	Estiércol	525	0
	Testigo	525	0
15 / 85	16	446,25	78,75
30 / 70	16	367,5	157,5

Se analizaron las actividades de las enzimas en los fermentados que contienen 15 y 30% de alofan, comparados a la actividad en estiércol y fermentado si adición de alofan. Se probó la actividad de las diferentes enzimas del fermentado obtenido con adición de dos proporciones de alofan, esto es la actividad enzimática determinada en estiércol sin fermentar (F), la actividad enzimática determinada en el fermentado sin adición de alofan (s/A), 16 d actividad del fermentado con alofan adicionado al final de la FES, que corresponden a los días en los cuales se adicionó el alofan a partir del inicio de

la FES. De acuerdo a los resultados, ejemplificados en la figura 10 donde se muestra la actividad de la fosfatasa acida, no existe diferencia significativa entre las relación alofán fermentado 15:85 y 30:85, por lo que proporciones analizadas, por lo cual, desde un punto de vista económico se recomienda
5 trabajar con una proporción de 15 % de alofan, con un 85% de fermentado.

III. Nueva fermentación en estado sólido para la maduración del fermentado.

10

Esta nueva fertilización en estado sólido se realiza con el objeto de reducir el número de patógenos, como resultado se obtiene un biofertilizante inocuo para las plantas y seguro para su uso. Como resultado de este proceso se logra la disminución significativa de los niveles de *E. coli* del fermentado, esto se puede
15 observar en la tabla 4.

Para determinar la cantidad de patógenos presentes en las diferentes etapas del proceso de obtención del biofertilizante, se realizó un muestreo correspondiente a diferentes tiempos y etapas del proceso, estos los se presentan a continuación:

- 20 a) Fermentado de estiércol bovino, fermentado durante 17 días a 35°C y 65% de Humedad, en reactor. Correspondiente a una muestra extraída desde la etapa 1.
- b) Fermentado de estiércol bovino, fermentado en pila, al aire libre por 90 días Correspondiente a una muestra extraída desde la etapa 1.
- 25 c) Fermentado en Etapa de Maduración, FES en pila, correspondiente a la etapa 3 del proceso.

Para el recuento de *Salmonella* sp se utiliza el método del número más probable, para lo cual, se pesan 100 g, 10 g y 1 g de las diferentes muestras en bolsas estériles, estas son enriquecidos con caldo lactosado, luego con un
30 Stomacher se homogeniza y se incuban por 24h a 35°C. Posteriormente se

realizan trasposos a medio selectivo para *Salmonella spp* Rappaport y *Vassiliadis* y se incuban por 24 horas a 35°C. Los tubos que presentan turbidez se traspasan a placas de agar SS y nuevamente se incuban 24h a 35°C. Las colonias sospechosas de *Salmonella* (no fermentadoras de lactosa y que producen H₂S) se verifican por Remel RapID ONE System.

Para el recuento de *Escherichia coli*, se preparan muestras de 25 g de cada condición y se colocan con 225 ml de diluyente, esta preparación se homogeniza en un Stomacher. Para el cultivo se siembran por el Método de Inclusión diferentes diluciones de la preparación anterior, en un medio de cultivo Chromocult, agar Coliformes ES. Las colonias sospechosas se confirman con escala bioquímica, TSI, LIA, MIO, Urea y Citrato.

El resultado de esta determinación se muestra en la tabla 5, en la cual se observa que el contenido de *E. coli* presenta una disminución en fermentado c.

Tabla 5: Recuento de bacterias patógenas.

ETAPA	Recuento <i>Salmonella</i> (NMP g-1)	Recuento <i>E. coli</i> (UFC g-1)
Fermentado a	< 0,3	6160000
Fermentado b	< 0,3	143000000
Fermentado c	< 3	210

Ejemplo 2: Evaluación del efecto de la formulación biofertilizante sobre cultivo de *Ballica perenne* (*Lolium perenne*).

Se evaluó el efecto de la formulación biofertilizante sobre el rendimiento de *Lolium perenne* L (Ballica). Se consideró porcentaje de germinación, altura de plantas jóvenes y rendimiento de materia seca.

Prueba de germinación:

En primer lugar, se realizó un test para evaluar el efecto de formulación biofertilizante sobre plántulas de ballica de 7 días de edad. Para esto se pre-germinaron semillas de *Ballica perenne* y, a los 7 días se trasplantaron a

macetas que contenían el biofertilizante y como testigo (control) se utilizó un compost comercial (Vitta Frut de Rosario S.A), las plantas se regaron con agua destilada y no se aportó ningún fertilizante adicional. Se evaluó el desarrollo de las plantas durante una semana. En la figura 11 se muestran los resultados, demostrándose que las plantas trasplantadas al compost comercial presentaron una alta mortalidad y menor desarrollo que las plantas tratadas con el nuevo biofertilizante.

En segundo lugar, se registró el porcentaje de germinación de las plantas cultivadas sobre un suelo mejorado con la adición del biofertilizante, y se comparó con los resultados obtenidos al germinar las semillas de ballica en un suelo con bajo contenidos de nutrientes (suelo control, tabla 6), sin tratar y en un suelo fertilizado de manera tradicional con un fertilizante mineral. En la figura 12 muestra un mayor porcentaje de germinación al usar biofertilizante, mientras que en el suelo fertilizado de manera tradicional hay una menor germinación que en el control, situación que quizá dé cuenta de la sensibilidad de la semilla al fertilizante mineral. Letras distintas indican diferencias significativas en los promedios de cada tratamiento (prueba T, $p < 0.05$).

Tabla 6: Caracterización química del suelo control.

N-NO₃ ppm	N-NH₄ ppm	S ppm	P ppm	M.O. %	pH*	C.E. dS/m
1,12	3,08	2,42 MB	6 B	2,66	5,88 mAC	0,037 S/R

Prueba de desarrollo de plantas:

El fermentado de estiércol bovino que se utilizó fue preparado a través de un proceso controlado durante 2 semanas a 35°C y con 60%HBH.

El ensayo se realizó en una cámara de incubación bajo condiciones de fotoperíodo de 16 horas de luz, temperatura de 22° C en el día y 15,5° C en la noche.

Como unidad experimental se utilizó macetas de 15 cm de diámetro con 1,5 kg de suelo bajo en nutrientes (tabla 6), el cual fue tamizado a 2 mm. A cada unidad experimental se agregó una dosis equivalente a 7 ton ha⁻¹ de

biofertilizante o fertilización inorgánica a concentraciones de nutrientes idénticas a las presentes en el biofertilizante, dejando un testigo o control sin fertilización. En el caso de la fertilización inorgánica el N se aplicará a la forma de urea, el P como súper fosfato triple, y el K se aportó a través de cloruro de potasio. En la tabla 7 se detallan los tratamientos y su composición. Se sembró 120 semillas de *Lolium perenne* L. var. NUI por unidad experimental. Una vez emergidas, se raleó dejando solo 100 plántulas por unidad. El diseño experimental es en bloques totalmente al azar con tres réplicas.

10 Tabla 7. Detalle de la composición de cada tratamiento de fertilización del suelo.

Tratamiento	Dosis de nutrientes		Fertilización	
Control	0		-	
Biofertilizante	56,317	kg N/ha	7	ton biofertilizante/ha
	54,6	kg P/ha		
	84	kg K/ha		
Fertilización Inorgánica	56,317	kg N/ha	122,428	kg urea/ha
	54,6	kg P/ha	271,813	kgSPT/ha
	84	kg K/ha	168	kg muriato de K/ha

Luego de 15 días de haber germinado las semillas, se midió la altura de plantas. En la figura 13 se observa una mayor altura de plantas con el tratamiento biofertilizante en comparación con los tratamientos control y fertilización mineral. Además, contrario a lo esperado, el tratamiento fertilización mineral no presentó diferencias significativas con el tratamiento control.

Después de dos meses de crecimiento se determinó la producción de materia seca de cada tratamiento. Los resultados demostraron que el tratamiento biofertilizante presentó una mayor producción de materia seca en comparación con los tratamientos control y fertilización mineral (Figura 14).