

SPAS, SISTEMA DE PRODUCCIÓN DE BIOMASA A BASE DE AZOTOBACTER EN ESTADO SEMISOLIDO.

Bernardo Dibut Álvarez, Rafael Martínez Viera, Marisel Ortega García, Luís Fey Gobín, Yoania Ríos Rocafull, Rosa García Gómez, Grisel Tejeda, María Elena Simanca y Janet Rodríguez.

**Instituto de Investigaciones Fundamentales en Agricultura Tropical (INIFAT)
Calle 2 esq. 1 Santiago de las Vegas, Ciudad de La Habana, Cuba, CP 17200.
Email: bdibut@inifat.co.cu**

RESUMEN

Se ofrecen los resultados obtenidos en la obtención, como una nueva alternativa, de un sistema de producción de biomasa en estado semisólido (SPAS) a base de la bacteria *Azotobacter chroococcum*, con el objetivo de enfrentar las dificultades actuales que presenta la industria de fermentaciones de estos biopreparados. Como resultante de los ensayos se logran obtener, a partir del crecimiento de la bacteria en placas petri de 14 cm de diámetro, dos cosechas de biomasa colectadas en la misma formulación nutritiva, lo que demuestra que el medio de cultivo Dimargon Modificado (Nº de registro de patente 0234/03) no se agota y permite la obtención de una segunda colecta donde se logra cosechar el 62 % en volumen de crema (76.30 mg/cm²) con relación a la biomasa colectada en el cultivo inicial (121.75 mg/cm²); además se logra reducir en un 53 % (7 g/L) la concentración y por tanto el consumo de agar en el medio de cultivo sin afectarse la consistencia del mismo, así como el crecimiento del microorganismo. En relación al potencial agrobiológico, se compara el efecto estimulador de la bacteria en ambas cosechas con relación a la altura de la planta, el número de hojas, el diámetro del tallo, el área foliar y el peso seco de plantas de tomate como cultivo indicador, comprobándose que no existe afectación alguna en cuanto al potencial bioestimulador aportado por la bacteria, el cuál varió entre 36-72 % de incremento para los diferentes parámetros evaluados en las plántulas con respecto al control sin bacterizar. Los datos así obtenidos fueron procesados estadísticamente por ANOVA y prueba de Newman Keuls al 5 % de significación a través del programa STAT-ITCF.4. En relación al impacto económico, la reducción de agar propuesta representa un beneficio de 0.50 CUC por cada hectárea a tratar con el biopreparado; además, la relación C/B resultante de la aplicación del sistema SPAS es de 79:1, lo que hace clara referencia al carácter atrayente desde el punto de vista comercial que presenta la nueva metodología.

Palabras claves: biomasa, *Azotobacter chroococcum*, sistema

SPAS , BIOMASS PRODUCTION SYSTEM FROM AZOTOBACTER IN SEMISOLID STATE.

ABSTRACT

Results in biomass production system on semisolid state (SPAS) from the bacteria *Azotobacter chroococcum* as a response to the present problems of fermentation industry is showed. As a result of this study we can obtain two biomass harvest in the same nutritive formulation from the bacterial growing in petries box of 14 cm of diameter. It is mean that the Dimargón Modified medium (0234/03 patent number) is not to use up and it permit to obtain a second harvest with a 62 % of cream volume (76.30 mg/cm²) in relation to the biomass collected on the beginning (121.75 mg/cm²). Besides this

formulation reduces the agar concentration in 53% (7 g/L) and it reduces agar consumption too without changes in a medium's properties and without changes in bacterial growing. Stimulant effect of the bacteria in both harvests was compared with the height, leaves number, stem diameter, leaves area and dry weight of tomato inoculated plants in relation to control plants. The results showed affectation of biostimulant potential give it by bacterial activity. Them, a change between 36-72% in comparison to no inoculated plants was obtained. Dates were evaluated by STA-ITFC 4 program using an Anova and Newman Keuls test at 5% of signifities. The economic impact is due to the agar reduction with a mean a 0.50 CUC benefice by hectare. The C/B relation is 79:1. That is why it is an attractive product from a commercial point of view.

Key Words: *Biomass, Azotobacter chroococcum, system.*

INTRODUCCIÓN

En la industria biotecnológica actual, uno de los indicadores a optimizar desde el comienzo del diseño de los procesos, radica en la economía de los sistemas ingenieriles que se proyectan (Chen, 1997; Quintero, 1995). La industria de los biofertilizantes no deja de seguir las mismas leyes en la obtención de las cartas tecnológicas que rigen la fabricación de biopreparados de uso agrícola, entre los que se incluyen las formas terminadas líquidas y sólidas de bioproductos que normalmente se aplican (Dibut, 2000; IFOAM, 2001).

Las formas terminadas de fabricación de biofertilizantes en fase sólida generalmente se basan en el empleo de soportes orgánicos como turba, cachaza, residuos sólidos de la producción vegetal y residuos sólidos urbanos, entre otros muchos sustratos. Estos soportes, a partir del tratamiento adecuado, contienen los microorganismos en número suficiente como para poder obtener el efecto agrobiológico que se desea sobre plantas cultivables cuando son aplicados, es decir, son el resultado de una fermentación que se produce en fase sólida como consecuencia de la inoculación microbiana que proviene a su vez de una fermentación en fase líquida efectuada en fermentadores aireados (Quintero, 1993; Dyson, 1996; Ladha, 1997; Hungria, 2000).

Así, en los últimos años, además de estos métodos de fabricación desarrollados en base a sustratos orgánicos, también se han generados procedimientos de producción de bacterias, hongos, virus y plantas "*in vitro*" donde se emplea como soporte sólido el polímero de agar que conforma, en el seno del líquido del medio de cultivo, un enrejado molecular que le confiere al sistema la fase sólida sobre la cuál se desarrollan los microorganismos, o se siembran las semillas pre-germinadas de plantas u órganos vegetales para su posterior multiplicación. En este sentido, se han reportado varios estudios donde se emplean sistemas de fabricación estáticos en fase sólida para la producción de biomasa a partir de determinadas especies de microorganismos (Izquierdo *et. al.*, 1995; Subba Rao, 1996; Bockman, 1997; Higa, 1999; Bauer, 2001; Sanjuan *et. al.*, 2004).

En Cuba, se han desarrollado diferentes formas de biopreparados (biofertilizantes y bioestimuladores) a base de la bacteria *Azotobacter chroococcum*, entre los que se incluyen productos líquidos y sólidos, todos con comprobado efecto en la práctica agrícola sobre diversos cultivos de importancia económica (Dibut, 2000, Martínez Viera *et al.*, 2003); sin embargo, una problemática presente hasta hoy consiste en la escasa

disponibilidad de capacidad fermentativa en el país, mas aún en los últimos tiempo donde por consecuencia del programa de redimensionamiento de la industria azucarera se han desactivado más del 60% de las bioplantillas destinadas a la producción de enzimas y biofertilizantes.

Por otra parte, a pesar de los esfuerzos desarrollados, es de destacar que la fabricación en forma sólida resulta algo costosa, fundamentalmente por concepto de la esterilización del soporte sólido que se emplea como base para la elaboración del bioproducto; o sea, se consume un índice energético elevado en este tratamiento, además de otros importes energéticos por concepto de esterilización de materiales y medios de cultivo requeridos para la elaboración del caldo bacteriano que es utilizado como inóculo del biopreparado sólido (Kannaiyar, 1997; Parr, 1999; Dibut 2000).

Teniendo en cuenta esta dificultad, se hace necesario diseñar sistemas productivos de la bacteria independientes de la presencia de fermentadores aireados de alto costo y difícil adquisición, además de reducir otros requerimientos altamente demandados por los Laboratorios Provinciales de Suelo del Ministerio de La Agricultura, como es el caso de depender de un menor consumo energético en el proceso de fabricación y la aplicación de menor cantidad de producto por unidad de superficie en la práctica agrícola; lo que contribuye sobremanera al ahorro de envases a utilizar, así como de las capacidades de transportación y almacenamiento dentro de la cadena de producción - aplicación de estos bioproductos.

En esta dirección, la producción en base a crema semisólida, puede constituir una forma eficiente de elaboración del biofertilizante, ya que el mismo se puede transportar y almacenar con gran facilidad. No obstante, en este sistema, se presenta como mayor limitante el elevado consumo de agar por litro de medio elaborado como base para el establecimiento del módulo de producción de *Azotobacter* en estado semisólido (SPAS). Es por ello que se plantea, junto con la concepción del nuevo procedimiento, estudiar la máxima reducción posible de agar en el sistema de tal forma que sin afectar la calidad del biopreparado que se obtiene, se contribuya a la economía de este proceso, todo lo cual constituye el objetivo de este trabajo.

MATERIALES Y MÉTODOS

Los ensayos microbiológicos , empleando como componente el medio de cultivo Dimargon - Modificado (número de patente 0234/03) , se desarrollan sobre la base del diseño de un sistema de producción de *Azotobacter* en estado semisólido (SPAS), a partir de la siembra en placas petri de 14 cm de diámetro conteniendo 38 mL del medio, de una alícuota de 2 mL de suspensión en agua estéril del microorganismo (cepa INIFAT-12 de *A.chroococcum*), obtenida del lavado de una cuña de cultivo microbiano en tubo de ensayo previamente crecido por asada en el mismo medio, bajo condiciones de 32^oC de temperatura, durante 72 h de incubación.

Las placas así inoculadas se incuban sobre estantes metálicos que sirven como soporte, bajo las mismas condiciones de temperatura, durante 48 horas. A partir de este tiempo, es posible colectar la primera cosecha del cultivo microbiano, observándose sobre la superficie del medio una abundante biomasa de color beige. La colecta se realiza mediante el empleo de una solución removedora compuesta por agua estéril suplementada con sacarosa al 20% y adicionada a razón de 20 mL/placa. Una vez removida toda la biomasa con ayuda de una espátula diseñada para tales fines, se

colecta la crema en un beaker estéril de 500 mL, y a partir de aquí, se trasvasa a frascos ámbar para su empleo y comercialización.

La segunda colecta se realiza de forma similar en cuanto a la inoculación de las placas, lo que, a diferencia de caso anterior, no se reinocula, sino se deja de forma homogénea sobre la superficie del medio una fina capa de la suspensión de biomasa excedente de la primera colecta que actúa en este caso como semilla o inóculo. Ya a las 48 horas de incubación a 32°C, el sistema está en condiciones para poder realizar la segunda cosecha, observándose en este caso menor cantidad de biomasa por unidad de superficie del cultivo, pero con las mismas características organolépticas de la inicial.

El efecto estimulador del microorganismo fue evaluado mediante la prueba de bioensayo en bandejas (Dibut *et al.*, 1990), con el empleo de suelo Ferralítico Rojo (Instituto de Suelos, 2000), cuya caracterización química se expone en la Tabla 1, como base para el crecimiento de plántulas de tomate (cv. Campbell-28) empleado en este caso como cultivo indicador debido a la alta respuesta que presenta ante la inoculación de la bacteria (Dibut 2000). Se evaluaron los parámetros: altura de la planta, número de hojas, diámetro del tallo, área foliar y el peso seco de las plántulas como indicadores de crecimiento y desarrollo vegetal. La biomasa bacteriana en mg/cm² de crema cosechada por superficie de medio de cultivo inoculado se evaluó como indicador de crecimiento microbiano en el sistema semisólido diseñado.

Cada experimento microbiológico se repitió cuatro veces y las pruebas de bioensayo tres veces. Los datos así obtenidos fueron procesados estadísticamente por prueba de t-Student, empleando el programa STAT-ITCF. 4.

Tabla 1. Características químicas del suelo empleado en las pruebas de bioensayo realizadas.

Tipo de suelo	M.O. (%)	N total (ppm)	PH (H ₂ O)	P ₂ O ₅ K ₂ O mg/100g	Ca Mg cmol ⁺ . Kg ⁻¹
Ferralítico Rojo Típico	2.12	42	7.2	48 56	9.7 3.3

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La elaboración de medios de cultivo resume, como principal requisito, un balance estequiométrico de sus componentes en relación con la demanda de estos elementos por parte del microorganismo seleccionado para ser crecido en el mismo (Kannaiyar, 1997). En otro orden, al agar como componente, se le atribuye la propiedad de solidificar la formulación propuesta y conferirle al medio la estructura físico-químico deseada, la que se corresponde con la concentración a adicionar en el medio de cultivo de este compuesto.

En la Tabla 2, se expone el crecimiento de *Azotobacter chroococcum* en el sistema de producción de biomasa en fase semisólida. Como se observa, se logró reducir la proporción de agar en el medio de cultivo Dimargon-M en un 53 %, correspondiente a su vez a un valor de siete gramos por litro, sin afectarse la biomasa colectada en el

sistema con respecto al control , ya que no se detectan diferencias significativas entre los valores de crema cosechada entre ambas variantes.

Tabla 2. Obtención de biomasa bacteriana y efecto de la reducción de agar como base del sistema SPAS (primera cosecha).

Variantes	Concentración de agar (g/L)	Biomasa colectada mg/cm²	Reducción de agar (%)
Variante I	8 gramos	120,20	53
Variante II (Medio control)	15 gramos	119,42	-
		N.S	

Nota: No se encontraron diferencias significativas según prueba de T con $p < 5\%$.

Otros ensayos fueron realizados experimentando reducciones inferiores a 8 g/L de concentración de agar, pero los resultados obtenidos no fueron satisfactorios en cuanto a la consistencia del medio, la cual afecta el rendimiento que se pueda obtener en la cosecha de biomasa, ya que este es un proceso de tipo aerobio estricto, y por consiguiente, se necesita que la bacteria crezca bajo una estructura bien sólida que permita que el desarrollo de la biomasa se ubique por encima de la superficie del medio de cultivo. Por otra parte, el no obtener una estructura sólida dificulta de forma operativa en gran medida la cosecha de la biomasa bacteriana, ya que esta se difunde en parte del medio y es imposible el recobrado de la misma.

Como índice para evaluar el efecto estimulador del microorganismo, en la Tabla 3, se ofrece el comportamiento de la bacteria sobre plántulas de tomate. En este caso, se observa un notable efecto de la crema bacteriana cosechada sobre las plantas con un promedio de más de 3.6 cm de altura, 1.5 hojas más por planta e incrementos de 2.56 cm en área foliar y 8.3 mg por planta de peso seco, todo con relación al control sin inocular. No se evaluó la concentración de 15 gramos por litro de agar (control de medio de cultivo) por estar demostrado con anterioridad en innumerables pruebas experimentales y de producción el efecto estimulador de la bacteria crecida bajo estas condiciones de ensayos (Dibut *et al.*, 1990; Martínez Viera *et al.*, 2003).

Tabla 3. Comportamiento de la bacteria, obtenida en la primera cosecha de biomasa, en relación a su efecto estimulador frente a plántulas de tomate.

Variantes	Altura (cm)	Nº de hojas	Diámetro del tallo (mm)	Área Foliar	Peso seco (mg/planta)
Variante I 8g/L	15,53 a	4,5 a	0,29 a	6,46 a	19,62 a
Variante II Control sin inocular	11,90 b	3,0 b	0,18 b	3,90 b	11,32 b

Nota : Medias con letras no comunes difieren significativamente entre sí según prueba de T, con $p < 5\%$.

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos, queda demostrado que al reducir a la mitad la proporción de agar, no se afecta el metabolismo bacteriano en cuanto a la

producción de sustancias fisiológicamente activas (auxinas, giberelinas, citoquininas, aminoácidos y vitaminas), las cuales actúan sobre el crecimiento y desarrollo de las plantas de tomate. El efecto aquí encontrado se corresponde con otros similares obtenidos en este mismo cultivo al ser tratado con la bacteria (Martínez Viera y Dibut, 1996).

Es de señalar que no se presentan datos del efecto agrobiológico de la bacteria crecida bajo SPAS en otros cultivos, ya que el cultivo del tomate es un real indicador para medir el efecto estimulador de *A.chroococcum*, de ahí que sea escogido como modelo para estudiar eventos fisiológico-bioquímicos por parte del microorganismo con valor agronómico (Chen, 1997; Dibut *et al.*, 1990).

En Microbiología Industrial, la eficiencia es un parámetro que se persigue desde el inicio del diseño de un proceso o sistema productivo (Quintero, 1993), por lo que la fabricación de biofertilizantes y/o bioestimuladores no queda al margen de este principio. Teniendo esto en cuenta, se diseñaron otros experimentos con el objetivo de comprobar la posibilidad de obtener una segunda cosecha de biomasa bacteriana a partir del medio de cultivo empleado inicialmente para el crecimiento del microorganismo y con la reducción de agar propuesta.

En la Tabla 4, se exponen los resultados obtenidos en estos ensayos, lográndose colectar hasta un 62 % del valor de la biomasa que se logra cosechar en una primera fase. Este comportamiento indica que el medio de cultivo está formulado en exceso, permitiendo así obtener esta segunda cosecha sin ser enriquecido con ningún nutriente.

Tabla 4. Eficiencia en la producción de biomasa del medio Dimargon-M en primera y segunda cosecha del sistema SPAS.

Variante	Biomasa colectada (mg/cm²)	% de Biomasa Recuperada
Cosecha I	121.75 a	-
Cosecha II	76.30 b	62

Nota : Medias con letras no comunes difieren significativamente entre sí, según prueba de T con $p < 5\%$.

En la industria de fermentaciones existen varias experiencias donde se logra obtener una segunda producción del microorganismo a reproducir en el sistema, como es el caso de algunos hongos filamentosos y levaduras (Quintero, 1993); aunque generalmente es necesario enriquecer el medio de cultivo con algún componente (nutriente) limitante para el normal crecimiento del organismo, con el objetivo de obtener, en esta segunda fase, rendimientos aceptables de biomasa para el proceso que se escala.

En el caso del medio Dimargon-M y bajo el módulo SPAS, este suplemento nutricional no es necesario para poder lograr un valor de biomasa (en segunda fase de crecimiento) justificable desde el punto de vista de rentabilidad del sistema, sobre todo si se compara con otros procesos industriales diseñados para otros microorganismos, donde el parámetro de biomasa recuperada oscila entre 25-50% (Quintero, 1993).

No obstante, en adición a los buenos resultados logrados en base a la fermentación microbiológica en estado sólido, y teniendo en cuenta el carácter estimulador de este microorganismo, igualmente se hace necesario comprobar esta capacidad para la biomasa bacteriana crecida en el segundo pase por el medio de cultivo.

En la Tabla 5, se ofrece el efecto de la bacteria sobre las plantas de tomate, demostrándose en cada parámetro evaluando una marcada superioridad en el incremento obtenido con respecto al control sin bacterizar. La altura de la planta varió en más de 4 cm a favor de la inoculación, así como el número de hojas por planta que resultó 1.7 superior. El diámetro del tallo varió en 0.15 mm, y se incrementaron en 2.23 cm el área foliar y en 8.14 mg el peso seco por planta cuando se inoculó la bacteria.

Tabla 5. Efecto estimulador del microorganismo obtenido en la segunda cosecha de biomasa bacteriana en el sistema SPAS.

Variantes	Altura (cm)	Nº de hojas	Diámetro del tallo (mm)	Area Foliar (cm²)	Peso Seco (mg/pl)
Control	11.20 b	3.1 b	0.23 b	5.20 b	11.28 b
Inoculado	15.30 a	4.8 a	0.38 a	7.43 a	19.42 a

Nota : Medias con letras no comunes difieren significativamente entre sí según prueba de T, con $p < 5\%$.

Como se puede comprobar, el microorganismo crecido bajo la segunda fase de reproducción sobre el medio de cultivo inicial no manifiesta ningún síntoma de afectación en cuanto al potencial de síntesis de sustancias activas y consecuentemente en su efecto estimulador. Es de señalar, que aunque el test de bioensayo que aquí se propone resulta suficiente como para evaluar el efecto estimulador, otras pruebas en campo han sido realizadas con biomasa obtenida producto de segundas cosechas con resultados muy positivos en cuanto al crecimiento, desarrollo y rendimiento de los cultivos inoculados (Dibut, 2003; Martínez Viera *et. al.*, 2003).

En la Tabla 6, al comparar el efecto estimulador de la biomasa bacteriana obtenida en cada una de las dos cosechas, con relación a los diferentes parámetros de crecimiento y desarrollo evaluados en plantas de tomate, se registran valores muy similares de aumento entre la primera y la segunda colecta de crema, por lo que una vez más queda demostrado que es posible la obtención de una segunda fase de crecimiento sin afectarse la calidad del biopreparado a emplear en la práctica agrícola.

Tabla 6. Comparación del efecto estimulador de la bacteria obtenida en la primera y segunda cosecha de biomasa colectada (expresado en por ciento con respecto al control sin inocular).

Cosechas	Altura (cm)	Nº de hojas	Diámetro del tallo (mm)	Area Foliar (cm²)	Peso seco (mg/pl)
Cosecha I	31	66	68	65	73
Cosecha II	36	54	65	69	72

Una vez comprobada la eficacia del nuevo sistema propuesto, solo resta detallar el diseño de producción que lo conforma; en este caso el módulo SPAS consiste en el empleo de un local debidamente aislado donde se ubican estantes metálicos (2.5 m alto x 3 m ancho x 0.6 m de profundidad y 0.25 m entre pisos) que portan placas petri de tamaño grande (14 cm de diámetro), las cuáles contienen cada una 38 mL de medio de cultivo Dimargon-M. El resto de las operaciones a realizar, hasta obtener la biomasa deseada se explicaron en el acápite correspondiente a los materiales y métodos

En relación al rendimiento biomasa/sustrato, por cada placa inoculada se obtienen aproximadamente 18 000 mg (18g) en primera cosecha y 10 900 mg (10.9 g) en segunda cosecha, por lo que si consideramos que la dosis recomendada para aplicar en la práctica sobre los cultivos es de 500g de biomasa por hectárea (Dibut , 2003; Martínez Viera *et al.*, 2003), con 28 placas, y una sola cosecha, se obtiene la cantidad de crema necesaria para beneficiar una hectárea de plantación.

Por último, y como principal ventaja del sistema, es de destacar la no dependencia en relación a una parte importante del equipamiento que normalmente se emplea en los Laboratorios Microbiológicos que desarrollan este tipo de fabricación, como es el caso de zarandas o agitadores orbitales y fermentadores industriales, los cuales presentan actualmente un alto costo en el mercado del equipamiento científico-tecnológico, además del consumo de energía que demandan en su explotación.

En este sentido, el sistema SPAS demanda un mínimo de consumo de energía, fundamentalmente por concepto de esterilización de la cristalería y medios de cultivo en autoclave, ya que los valores de temperatura en el proceso de incubación (entre 30-32°C) para lograr el normal crecimiento de este microorganismo, se obtiene por lo general, en el caso de Cuba, bajo condiciones de temperatura ambiente durante la mayor parte del año.

Desde el punto de vista económico, por concepto de ahorro de 7 g/L de agar, teniendo en cuenta el costo de un gramo del compuesto (0.068 CUC), se logra un efecto económico de 0.48 CUC por cada litro de medio de cultivo Dimargon-M elaborado para la fabricación. Si consideramos que la cantidad de biomasa necesaria para aplicar una hectárea requiere de la preparación de 1.06 L del medio de cultivo, el beneficio por concepto de reducción de agar sería de 0.50 CUC por cada hectárea cultivable a tratar con biofertilizantes a base de *Azotobacter chroococcum* producidos mediante el sistema SPAS.

Por otra parte, teniendo en cuenta otros conceptos de gastos de producción de 1 L de crema como: Consumo energético por esterilización (0.01 CUC), costo del medio de cultivo (0.18 CUC), salario del personal técnico y administrativo involucrado en el proceso productivo (4.6 pesos) y costo de envases y cristalería (1.70 CUC), tendríamos un costo total por cada litro de biomasa de 4.6 pesos y 1.89 CUC.

Ahora, considerando que en el caso de Cuba, este producto se comercializa en pesos; así como el beneficio que se obtiene al ser aplicado sobre los cultivos, que igualmente se valora en pesos, se debe asumir un costo complementario en pesos con el objetivo de poder evaluar la relación C/B generada; por tanto el costo total de un litro de biomasa sería de 6.49 pesos.

Finalmente, si consideramos que en la práctica agrícola se aplican 500 g (0.5L) de biomasa por hectárea cultivable (Dibut , 2003; Martínez Viera *et al.*, 2003), el costo de producto a aplicar por cada hectárea sería de 3.24 pesos, más 2.63 pesos por concepto de costo de aplicación, para un total de 5.87 pesos/ha. En esta misma dirección, si consideramos que el beneficio promedio que se obtiene al aplicar este biopreparado sobre cultivos económicos, oscila entre 460-930 pesos/ha (Dibut 2000; Martínez Viera *et al.*, 2003), se tendría, considerando el menor valor de ganancia, una relación C/B de 79:1, por lo que se puede estimar de elevada, ya que al introducir o transferir nuevas tecnologías, sólo se exigen relaciones beneficio/costo superiores a 2 para que se considere una inversión atractiva desde le punto de vista comercial (FAO, 1995; Sasson, 2000).

A esto se une el beneficio social por concepto de generación de nuevos empleos para desarrollar el proceso de fabricación propuesto; así como por el nuevo personal que se contrate con el objetivo de realizar la tarea de extensionismo en la introducción y manejo de la nueva forma terminada del biofertilizante en áreas agrícolas, pertenecientes tanto al sistema de la Agricultura Urbana como a la agricultura convencional.

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

El sistema SPAS, constituye una alternativa efectiva y poco costosa para enfrentar la demanda de fabricación de biofertilizantes a base de *Azotobacter chroococcum* en el país, los cuales se aplican a dosis reducida por unidad de superficie cultivable con el consecuente beneficio económico y social para la comunidad agrícola cubana. Se recomienda la completa introducción del nuevo procedimiento a todos los Laboratorios Provinciales de Suelos y bioplantitas que conforman la Red Nacional de Fabricación de Biofertilizantes del Ministerio de la Agricultura; así como la transferencia tecnológica del sistema a otros países con interés en la fabricación de estos biopreparados.

REFERENCIAS

- Bauer, T. (2001):** Microorganismos Fijadores de nitrógeno. En: (<http://11w.w.w.microbiología.com.ar/suelo/rhizobium.html>).
- Böckman, O. (1997):** Non biological nitrogen fixation. En: Biological Nitrogen Fixation. The Global Challenge and Future Needs, Roma, pp 24-26.
- Dibut Alvarez, B. (2003):** Biofertilización. Biotecnología indispensable para el desarrollo de la Agricultura Sostenible. En: Memorias Congreso Internacional CIM BIOS 2003, Mérida, Yucatán, 35 pp.
- Dibut Álvarez, B. ; R. Martínez Viera; R. González; E .Delgado y B. Martín (1990):** Evaluación de cepas de *Azotobacter chroococcum* aisladas de suelos de Cuba. I Actividad estimuladora del crecimiento en plántulas de tomate. *Cien. Agric.*, 40: 11-16.
- Dibut, Alvarez, B. (2000):** Obtención de un bioestimulador del crecimiento y el rendimiento vegetal para el beneficio de la cebolla (*Allium cepa L.*). Tesis de Doctor en Ciencias Agrícolas, Ministerio de la Agricultura, La Habana, 104 p.
- Dyson T. (1996):** Population and Foods. Global Trends and Future Prospects. Global Environmental Programmer, Rutledge, ISBN. 0-415-11975-8, 45 pp.
- FAO (1995):** Manual Técnico de la Fijación Biológica del Nitrógeno, Roma, 160 pp.
- Higa, T. (1999):** Effective microorganisms: Their role in Kusei Nature Farming and Sustainable Agricultura. En Proceedings of the Third International Conference on Kusei Nature Farming, U.S. Department of Agriculture, Washington, pp 161-184.

- Hungria, M., R.J. Campo e I.C. Mendes (2000):** Fixacao biologica do nitrogenio com a cultura da soja. En: Workshop nitrogenio na sustentabilidade de sistemas intensivos de producao agropecuaria, Ed. Mercante, Rio de Janeiro, pp 51-71.
- IFOAM (2001):** What is IFOAM. En: (<http://ecoweb.dk/ifoam>).
- Izquierdo J. L. Ciampi y E. de García (1995):** Biotecnología apropiable: racionalidad de su desarrollo y aplicación en América Latina y el Caribe, FAO, Santiago de Chile, 80pp.
- Kannaiyar S. (1997):** The Indian experience for using biofertilizens. En Biological Nitrogen Fixation: The Global Challenge and Future Needs: A Symposium, Roma, pp 69-70.
- Ladha J.K. (1997):** Biofertilizers: The way ahead ?. En Biological Nitrogen Fixation: The Global Challenge and Future Needs: A Symposium, Roma, pp 67-69.
- Martínez Viera R. y B. Dibut (1996):** Los biofertilizantes como pilares básicos de la agricultura sostenible. En Curso-Taller sobre Gestión Medioambiental de Desarrollo Rural, La Habana, pp 62-81.
- Martínez Viera, R.; B. Dibut Alvarez ; R. García y G. Tejada (2003):** Informe Final del Proyecto "Obtención de un biofertilizante multipropósito para uso de la Agricultura Urbana", La Habana, 75 pp.
- Parr, J.F., S.B. Hornick y D.D. Kaufman (1999): Use of microbial inoculants and organic fertilizers in agricultural production. Published by The Food and Fertilizer Technology, Taipei, pp.228-245.
- Quintero, R. (1993):** *Ingeniería Bioquímica. Teoría y Aplicaciones*. Ed. Alhambra, Mexicana, 335 pp.
- Quintero, R. (1995):** Consideraciones sobre la selección y ejecución de proyectos en Biotecnología. *Ava.Biothec. Moder.*, 3: 51-52.
- Sanjuan, J., S.A. Herrera - Cervera, A.I. Rodriguez-Alonso y J. Olivares (2004):** Transformación genética en el suelo y biodiversidad (<http://nostoc.usal.es/sefin/sanjuan.html>).
- Sasson, A. (2000):** La contribución de las biotecnologías a la alimentación. *Biotecnología Aplicada*. Vol 17 (1): 2-6.
- Subba Rao, N.S. (1996):** Interaction of Nitrogen-fixing microorganisms with other soil microorganisms. En Biological Nitrogen Fixation, Marcel Decker Ed., Nueva York, pp 37-63.