

**INSTITUTO TECNOLÓGICO DE COSTA RICA  
CAMPUS TECNOLÓGICO LOCAL SAN CARLOS**

**EVALUACIÓN DE BIOPROTECTION AZV-C (*Azotobacter  
chroococcum*) COMO COMPLEMENTO DE LA FERTILIZACIÓN  
NITROGENADA PARA EL CRECIMIENTO DEL CULTIVO DE LA  
PIÑA (*Ananas comosus* var. *comosus*) HÍBRIDO MD-2 EN PIEDRA  
ALEGRE DE PITAL, COSTA RICA**

Trabajo Final de Graduación presentado  
a la Escuela de Agronomía  
como requisito parcial para optar al grado de  
Licenciatura en Ingeniería en Agronomía

**JOSE PABLO CARRANZA ALVARADO**

**2020**



Carrera de Ingeniería en Agronomía  
Campus Tecnológico Local  
San Carlos  
2019 - 2023

**EVALUACIÓN DE BIOPROTECTION AZV-C (*Azotobacter chroococcum*) COMO COMPLEMENTO DE LA FERTILIZACIÓN NITROGENADA PARA EL CRECIMIENTO DEL CULTIVO DE LA PIÑA (*Ananas comosus* var. *comosus*) HÍBRIDO MD-2 EN PIEDRA ALEGRE DE PITAL, COSTA RICA**

**JOSE PABLO CARRANZA ALVARADO**

Aprobado por los miembros del Tribunal Evaluador:

Ing. Agr. Parménides Furcal Beriguete, M. Sc.

\_\_\_\_\_  
Asesor principal

Ing. Agr. Miguel Obregón Gómez, Ph.D

\_\_\_\_\_  
**† (fallecido)**

Asesor externo

Ing. Biot. Fabián Echeverría Beirute, Ph.D

\_\_\_\_\_  
Jurado

Ing. Agr. Zulay Castro Jiménez, MGA.

\_\_\_\_\_  
Jurado

---

Ing. Agr. Zulay Castro Jiménez, MGA.

\_\_\_\_\_  
Coordinadora

Trabajos Finales de Graduación

Ing. Agr. Milton Villarreal Castro, Ph.D

\_\_\_\_\_  
Director

Escuela de Agronomía

**2020**

## **AGRADECIMIENTO**

A Dios todopoderoso que ha llenado mi vida de bendiciones y me dio la oportunidad de estudiar esta hermosa carrera.

Agradezco a todo el personal de Agroindustrial Tres Amigos S.A. por su colaboración en el proyecto y la transmisión de conocimiento. Especialmente al Ingeniero Keylor Vargas Esquivel por aceptar la investigación y a mi gran amigo el Ingeniero Joan Rojas Ramírez (Goofy) por el seguimiento, consejos y ayuda brindada durante el proceso.

Asimismo, agradecer a Laboratorios Obregón, quienes depositaron en mí la confianza para desarrollar este estudio, principalmente al Dr. Miguel Ángel Obregón y la Ingeniera Tania Alvarado quien me brindó enormemente su ayuda de principio a fin.

Al Ingeniero Parménides Furcal Beriguete por el apoyo, conocimiento brindado y ser el guía en este proyecto. De igual forma agradezco a todos los profesores y funcionarios de la Escuela de Agronomía que fueron parte de mi formación.

Finalmente, agradecer a la generación 2014 y a los compañeros que tuve especialmente en la parte final de la carrera.

## **DEDICATORIA**

A mis padres por el gran esfuerzo y sacrificio que hicieron para brindarme la oportunidad de acceder a la universidad. Desde pequeño me inculcaron los valores del respeto, la honestidad, la responsabilidad; me enseñaron la importancia del estudio, la amabilidad y la humildad.

Este logro también es para mi hermano, el Ingeniero Ricardo Carranza Alvarado, quien académicamente siempre ha sido un ejemplo para mí. De él he aprendido que aceptar nuevos retos y salir de la zona de confort siempre trae su recompensa.

Finalmente dedicarles este triunfo a esas personas cercanas que han estado conmigo en las buenas y en las malas.

## TABLA DE CONTENIDOS

<b>1. INTRODUCCIÓN</b> .....	1
1.1 Objetivo General .....	3
1.2 Objetivos Específicos .....	3
1.3 Hipótesis de Trabajo.....	3
<b>2. REVISIÓN DE LITERATURA</b> .....	4
2.1 Generalidades del cultivo .....	4
2.2 Descripción morfológica .....	4
2.2.1 Hojas .....	4
2.2.2 Tallo.....	7
2.2.3 Raíz .....	7
2.2.4 Inflorescencia y Fruto.....	7
2.3 Propagación de la piña.....	8
2.4 Requerimientos edafoclimáticos.....	9
2.4.1 Temperatura .....	9
2.4.2 Precipitación .....	10
2.4.3 Viento .....	10
2.4.4 Suelo .....	11
2.5 Nutrición de la planta.....	11
2.5.1 Nitrógeno .....	12
2.6 Análisis foliares .....	12
2.6.1 Momento de muestreo .....	13
2.6.2 Sección de la hoja D a analizar.....	13

2.6.3	Contenido foliar de nitrógeno .....	14
2.6.1	Deficiencias y exceso de nitrógeno .....	15
2.7	Fertilización Nitrogenada .....	17
2.7.1	Curva de absorción de nitrógeno .....	17
2.7.2	Dosis de nitrógeno en el cultivo de piña .....	17
2.7.3	Fertilizantes nitrogenados sintéticos .....	18
2.7.4	Transformaciones del nitrógeno en el suelo .....	18
2.8	Implicaciones de las fuentes sintéticas de nitrógeno .....	20
2.9	Búsqueda de alternativas al nitrógeno sintético .....	21
2.9.1	Biofertilizantes .....	22
2.9.2	Rizobacterias promotoras del crecimiento en plantas (PGPR) ....	23
2.10	<i>Azotobacter</i> sp. ....	24
2.10.1	Morfología de <i>Azotobacter</i> sp. ....	25
2.11	Condiciones para el desarrollo de <i>Azotobacter</i> sp. ....	26
2.11.1	Temperatura .....	26
2.11.2	pH del suelo .....	26
2.11.3	Conductividad eléctrica (CE) .....	26
2.11.4	Productos fitosanitarios (Plaguicidas) .....	26
2.12	Población de <i>Azotobacter</i> sp .....	27
2.13	Beneficios de <i>Azotobacter</i> sp. en el crecimiento de las plantas .....	27
2.13.1	Producción de Hormonas .....	27
2.13.2	Solubilización de fosfatos .....	28
2.13.3	Reducir o suprimir el efecto de plagas .....	28
2.13.4	Fijación biológica de nitrógeno (FBN) .....	28
2.14	Enzima nitrogenasa .....	29

2.15	Molibdeno nitrogenasa .....	30
2.16	Mecanismo de fijación biológica de nitrógeno .....	30
2.17	Condiciones que afectan mayormente la FBN.....	32
2.17.1	Oxígeno .....	32
2.17.1	Nitrógeno amoniacal .....	33
<b>3.</b>	<b>MATERIALES Y MÉTODOS .....</b>	<b>34</b>
3.1	Ubicación del estudio .....	34
3.2	Época .....	34
3.2.1	Condiciones ambientales .....	34
3.3	Material de estudio .....	35
3.4	Área y unidad muestral.....	36
3.4.1	Parcela útil .....	36
3.5	Descripción de tratamientos .....	37
3.5.1	Descripción de Bioprotection AZV-C .....	38
3.6	Preparación de los tratamientos .....	38
3.7	Aplicación de los tratamientos .....	40
3.8	Metodología de muestreo en plantas.....	41
3.8.1	Peso fresco de la planta.....	42
3.8.1	Número de hojas.....	43
3.8.2	Longitud de la hoja D .....	43
3.8.3	Ancho de la hoja D.....	43
3.8.4	Peso de la hoja D.....	43
3.8.5	Área foliar de la hoja D.....	43
3.8.6	Peso seco de la planta.....	43
3.8.7	Análisis foliar.....	45

3.8.8	Análisis químico de suelo.....	46
3.8.9	Análisis microbiológico de suelo .....	47
3.9	Diseño experimental.....	47
3.9.1	Modelo estadístico .....	48
3.9.2	Croquis sobre la distribución de los tratamientos .....	48
3.9.3	Plan de análisis estadístico .....	48
<b>4.</b>	<b>RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....</b>	<b>49</b>
4.1	Análisis químico área experimental .....	49
4.2	Conductividad eléctrica y pH de las disoluciones de los tratamientos.....	50
4.3	Población de <i>Azotobacter chroococcum</i> en el suelo.....	52
4.4	Contenido de Nitrógeno.....	54
4.5	Peso fresco de la planta .....	56
4.6	Peso seco de la planta .....	60
4.7	Peso, longitud y ancho de hoja D .....	62
4.7.1	Peso fresco de la hoja D .....	62
4.7.2	Largo de la hoja D.....	63
4.7.3	Ancho de la hoja D.....	65
4.7.4	Correlación con el peso fresco de la planta.....	65
4.8	Área foliar de la hoja D .....	66
4.9	Número de hojas .....	67
4.10	Análisis Económico .....	69
<b>5.</b>	<b>CONCLUSIONES .....</b>	<b>71</b>
<b>6.</b>	<b>RECOMENDACIONES.....</b>	<b>72</b>
<b>7.</b>	<b>LITERATURA CONSULTADA .....</b>	<b>73</b>
<b>8.</b>	<b>ANEXOS.....</b>	<b>83</b>

## LISTA DE CUADROS

Cuadro	Título	Página
1	Número de hojas determinadas en plantas de piña (n = 25) de tres variedades distintas.	5
2	Resultados de mediciones efectuadas en la hoja D para la evaluación del crecimiento de la planta de piña.	6
3	Contenido óptimo de nitrógeno foliar (%) según diversos autores.	15
4	Dosificación total acumulada de nitrógeno para un programa de fertilización preforza según varios autores.	18
5	Índice de acidez fisiológica de algunos fertilizantes nitrogenados.	21
6	Biofertilizantes utilizados en la agricultura para incrementar el crecimiento de los cultivos.	23
7	Compuestos químicos que son exudados por la planta a través de su raíz y aprovechados por las rizobacterias.	24
8	Descripción de los tratamientos utilizados para la evaluación del producto Bioprotection AZV-C como fijador de nitrógeno, Agroindustrial Tres Amigos S.A., Pital, 2019.	38
9	Ejemplo de la reducción de nitrógeno en la preparación de cada uno de los tratamientos, Agroindustrial Tres Amigos S.A., Pital, 2020.	39
10	Cronograma de aplicaciones de los ciclos de fertilización en el bloque 35 del lote 20, Agroindustrial Tres Amigos S.A., Pital, 2020.	41

<b>11</b>	Resultado del análisis químico del estado de fertilidad del suelo en el área experimental al inicio y al final de la investigación, Agroindustrial Tres Amigos S.A., Pital, 2020.	49
<b>12</b>	Relación de bases catiónicas en el suelo del área experimental al inicio y al final de la investigación, Agroindustrial Tres Amigos S.A., Pital, 2020.	49
<b>13</b>	Características químicas presentes en las soluciones de los programas de fertilización en Agroindustrial Tres Amigos S.A., Pital, 2019.	51
<b>14</b>	Estudio poblacional (UFC/g) de <i>Azotobacter chroococcum</i> en dos etapas posteriores a la aplicación de Bioprotection AZV-C en plantas de piña, Agroindustrial Tres Amigos S.A., Pital, 2020.	52
<b>15</b>	Concentración de nitrógeno en materia seca y su extrapolación a la densidad de siembra por hectárea en plantas de piña bajo distintas dosis de nitrógeno y la adición de Bioprotection AZV-C, Agroindustrial Tres Amigos S.A., Pital, 2020.	55
<b>16</b>	Muestreo de peso fresco 230 DDS realizado por el departamento de servicios técnicos de Agroindustrial Tres Amigos S.A., Pital, 2020.	59
<b>17</b>	Comportamiento del peso fresco hoja D a través del tiempo en plantas de piña bajo distintas dosis de nitrógeno y la adición de Bioprotection AZV-C, Agroindustrial Tres Amigos S.A., Pital, 2020.	63
<b>18</b>	Comportamiento de la longitud de la hoja D a través del tiempo en plantas de piña bajo distintas dosis de nitrógeno y la adición de Bioprotection AZV-C, Agroindustrial Tres Amigos S.A., Pital, 2020.	64

<b>19</b>	Comportamiento del ancho hoja D a través del tiempo en plantas de piña bajo distintas dosis de nitrógeno y la adición de Bioprotection AZV-C, Agroindustrial Tres Amigos S.A., Pital, 2020.	65
<b>20</b>	Coeficiente de correlación de Pearson para las variables peso, largo y ancho de la hoja D, respecto al peso fresco de la planta a los 260 DDS, Agroindustrial Tres Amigos S.A., Pital, 2020.	66
<b>21</b>	Análisis de costos variables dentro de los tratamientos propuestos para fertilización nitrogenada, Agroindustrial Tres Amigos S.A., Pital, 2020.	69

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura</b>	<b>Título</b>	<b>Página</b>
<b>1</b>	Forma acanalada de una hoja de piña y los medios que le permiten almacenar agua.	5
<b>2</b>	Identificación de la hoja D en la planta de piña.	6
<b>3</b>	Corte longitudinal de la Inflorescencia e infrutescencia del cultivo de la piña.	8
<b>4</b>	Diferentes tipos de hijos según su posición en la planta madre.	9
<b>5</b>	Efecto de la temperatura en el crecimiento de las hojas y las raíces en el cultivo de piña.	10
<b>6</b>	Contenido de nitrógeno (g/kg) según la sección de la hoja D analizada.	14
<b>7</b>	Área productiva con fertilización continua (izquierda) vs fertilización discontinua de 5 semanas (derecha).	16
<b>8</b>	Tonalidades en las hojas de piña asociadas a exceso de nitrógeno (izquierda) y a severas deficiencias del mismo (derecha).	16
<b>9</b>	Curva de absorción de nitrógeno en piña de primera cosecha.	17
<b>10</b>	Procesos bióticos y abióticos involucrados en la dinámica del nitrógeno.	19
<b>11</b>	Incremento momentáneo del pH del suelo a partir de la aplicación de urea.	20
<b>12</b>	Fotografía de Azotobacter sp. mediante microscopio de barrido electrónico.	25
<b>13</b>	Representación esquemática del ciclo de nitrógeno (cifras en millones de toneladas métricas).	29

<b>14</b>	Ciclo de catálisis para la reducción del N <sub>2</sub> realizado por la unidad I de la enzima nitrogenasa.	31
<b>15</b>	Comportamiento de la temperatura (°C) máxima y mínima durante el período preforza de la plantación.	35
<b>16</b>	Comportamiento de la precipitación (mm) durante el período preforza de la plantación.	35
<b>17</b>	Demarcación del bloque utilizado para la distribución del área experimental, Agroindustrial Tres Amigos S.A, Pital, 2020	36
<b>18</b>	Representación gráfica de la unidad muestral y parcela útil de cada uno de los tratamientos mediante fotografía aérea, Agroindustrial Tres Amigos S.A, Pital, 2020.	37
<b>19</b>	Sitio, instrumentos y envases utilizados para la preparación de los tratamientos en los ciclos de aplicación, Agroindustrial Tres Amigos S.A., Pital, 2019.	39
<b>20</b>	Metodología de aplicación empleada desde el ciclo uno hasta el ciclo seis en las repeticiones de los distintos tratamientos, Agroindustrial Tres Amigos S.A., Pital, 2019.	40
<b>21</b>	Pesaje de las plantas (kg) sin su sección radicular en el balancín colgable digital, Agroindustrial Tres Amigos S.A., Pital, 2020.	42
<b>22</b>	Proceso de secado de la submuestra hoja y submuestra tallo para cada repetición, Laboratorio de Análisis Agronómicos, TEC San Carlos, 2020.	44
<b>23</b>	Preparación de las muestras para el análisis foliar mediante el método de Dumas.	45
<b>24</b>	Metodología de cuarteo para la muestra, Agroindustrial Tres Amigos, S.A., Pital, 2020.	46

<b>25</b>	Representación esquemática de los cinco tratamientos en cada bloque experimental, Agroindustrial Tres Amigos S.A., Pital, 2020.	48
<b>26</b>	Comportamiento del peso fresco (kg) a través del tiempo en plantas de piña bajo distintas dosis de nitrógeno y la adición de Bioprotection AZV-C, Agroindustrial Tres Amigos S.A., Pital 2020.	58
<b>27</b>	Comportamiento del peso seco (g) a través del tiempo en plantas de piña bajo distintas dosis de nitrógeno y la adición de Bioprotection AZV-C, Agroindustrial Tres Amigos S.A., Pital 2020.	61
<b>28</b>	Comportamiento en el área foliar (cm <sup>2</sup> ) a través del tiempo en plantas de piña bajo distintas dosis de nitrógeno y la adición de Bioprotection AZV-C, Agroindustrial Tres Amigos S.A., Pital 2020.	67
<b>29</b>	Número de hojas emitidas por las plantas de piña bajo distintas dosis de nitrógeno y la adición de Bioprotection AZV-C, Agroindustrial Tres Amigos S.A., Pital, 2020.	69

## RESUMEN

El objetivo de esta investigación fue evaluar el efecto de Bioprotection AZV-C (*Azotobacter chroococcum*) como complemento de fertilización nitrogenada preforzamiento, por su función como organismo diazótrofo. El estudio tuvo lugar en la finca Agroindustrial Tres Amigos S.A., ubicada en Pital de San Carlos; el mismo dio inicio en junio del 2019 con la siembra y finalizó en marzo del 2020 con la inducción floral. Los tratamientos se plantearon haciendo una reducción del 20% (T<sub>2</sub>), 30% (T<sub>3</sub>), 40% (T<sub>4</sub>) y 50% (T<sub>5</sub>) respecto a la dosis comercial utilizada por la finca (T<sub>1</sub>). Las reducciones se mantuvieron los primeros seis ciclos de fertilización y Bioprotection AZV-C fue agregado en cuatro de ellos. A partir del séptimo ciclo de fertilización se continuó con el 100% de nitrógeno en todos los tratamientos. Las variables evaluadas fueron peso fresco planta, peso seco planta, contenido foliar de nitrógeno, peso, longitud, ancho y área foliar de la hoja D, número de hojas en la planta y finalmente la población de *A. chroococcum* en el área experimental. Se determinó que los tratamientos 100% nitrógeno (finca), reducción 20% + Bioprotection y reducción 30% + Bioprotection, ofrecieron las mayores tasas de crecimiento, sin presentar diferencias significativas ( $p > 0,05$ ) entre sí en la mayoría de las variables estudiadas. Asimismo, las reducciones 20% + Bioprotection y 30% + Bioprotection generaron una reducción de costos respecto a lo utilizado por la finca (T<sub>1</sub>).

**Palabras clave:** fijación biológica, nitrógeno, bacteria diazótropa, peso planta, inducción floral.

## ABSTRACT

The objective of this research was to evaluate the effect of *Azotobacter chroococcum* as a pre-forcing nitrogen fertilization complement, due to its function as a diazotrophic organism. The study took place at the Agroindustrial Tres Amigos S.A. farm, located in Pital de San Carlos. It began in June 2019 with the sowing and ended in March 2020 with the floral induction. The treatments were established making a reduction of 20% (T<sub>2</sub>), 30% (T<sub>3</sub>), 40% (T<sub>4</sub>) and 50% (T<sub>5</sub>) with respect to the commercial amount used by the farm (T<sub>1</sub>). The reductions were maintained for the first six fertilization cycles and Bioprotection AZV-C was added in four of them. From the seventh fertilization cycle onwards, 100% nitrogen was added in all treatments. The variables evaluated were plant fresh weight, plant dry weight, leaf nitrogen content, weight, length, width and leaf area of D leaf, number of leaves on the plant and finally the population of *A. chroococcum* in the experimental area. It was determined that treatments 100% nitrogen (farm), 20% reduction + Bioprotection and 30% reduction + Bioprotection, provided the highest growth rates, without displaying significant differences ( $p > 0.05$ ) between them in most of the variables studied. Likewise, the reductions of 20% + Bioprotection and 30% + Bioprotection, generated a cost reduction with respect to what is used by the farm (T<sub>1</sub>).

**Key words:** biological fixation, nitrogen, diazotrophic bacteria, plant weight, floral induction.

# 1. INTRODUCCIÓN

En Costa Rica la piña (*Ananas comosus* var. *comosus*) es uno de los cultivos que mayor desarrollo ha tenido en los últimos años, tanto en expansión como en producción y exportación. Actualmente el mercado costarricense se compone de 170 productores de piña que ocupan 40 000 ha de terreno, siendo la Región Huetar Norte la principal zona productora (CANAPEP 2020).

En el año 2018 este cultivo se ubicó como el segundo producto agrícola más exportado; siendo superado por el banano (PROCOMER 2019). En ese mismo año se produjeron 3 418 115 toneladas de piña fresca generando divisas por 983 000 000 de dólares. Estados Unidos es el principal destino de este producto adquiriendo el 47,95% de la producción (PROCOMER 2020 y FAO 2019).

Para lograr estas producciones es necesario implementar medidas que favorezcan el adecuado desarrollo del cultivo. Uno de estos aspectos clave es la nutrición de la planta, ya que la fertilización propicia el crecimiento y desarrollo de la misma, brindando la capacidad de generar un fruto comercial.

La fertilización del cultivo está inmersa en el paquete tecnológico que ajusta cada finca según sus condiciones. La finalidad de realizar fertilizaciones continuas es que la planta logre alcanzar el peso adecuado para ejecutar la inducción floral en el menor tiempo posible. Es por esto que la cantidad de ciclos de aplicación puede variar entre 14 y 18, dependiendo si se efectúan dos o tres veces al mes (Garita 2014).

En estos ciclos de aplicación los elementos de mayor protagonismo son el nitrógeno y el potasio. El primero por su gran influencia sobre el crecimiento de la planta y el segundo principalmente por su injerencia en la calidad de fruta. Para alcanzar el peso adecuado de una planta para la inducción floral, se requiere suministrar a este cultivo cantidades de nitrógeno que van desde los 294 kg/ha hasta los 630 kg/ha o más dependiendo de la densidad de plantación.

Sin embargo, se debe señalar que por comportamientos químicos propios del nitrógeno y de las condiciones ambientales, no es posible un aprovechamiento total de la dosificación realizada. La eficiencia en el uso de fertilizantes nitrogenados a nivel mundial es alrededor de 47% (Lassaletta *et al.* 2014). La

fracción de este fertilizante nitrogenado que no es aprovechado por las plantas se escapa hacia la atmósfera posibilitando la formación de gases de efecto invernadero. Asimismo, por medio de la humedad del suelo se moviliza a través de su perfil hasta llegar a los mantos acuíferos o bien, por escorrentía a fuentes superficiales de agua ocasionando la contaminación de las mismas (Estupiñán-Silva y Quesada 2010).

Aunado a esto la fabricación de fertilizantes nitrogenados conlleva un alto costo energético, se dice que aproximadamente entre 1,5% y 2% de la energía mundial es utilizada para este proceso (Ludewig 2019). Es por esto que se deben buscar fuentes alternativas a los fertilizantes nitrogenados para el suministro de este elemento (Molina 2003).

En búsqueda de este propósito se han realizado estudios con distintos materiales de origen animal (Rodríguez 2010). Sin embargo, también existen microorganismos en el suelo como las bacterias del género *Azotobacter* (*A. vinelandii*, *A. chroococcum*, *A. beijerinckii*) que son capaces de convertir el nitrógeno atmosférico ( $N_2$ ) en compuestos que pueden ser aprovechados por las plantas ( $NH_4^+$  y  $NO_3^-$ ), logrando una fijación de 20 kg N/ha/año (Marca 2017, Kumari *et al.* 2017).

*Azotobacter chroococcum* es una bacteria gram negativa que se encuentra de manera reducida en la rizosfera de la mayoría de los cultivos. Este microorganismo además de la conversión de nitrógeno, tiene la capacidad de estimular el crecimiento de la planta mediante la síntesis de reguladores de crecimiento y de producir sustancias que protegen a la planta de patógenos (Kumar Das 2019).

En la actualidad sigue sin conocerse los posibles efectos de Bioprotection AZV-C como fuente de *Azotobacter chroococcum* sobre el crecimiento del cultivo de la piña. Es por esto que el propósito del presente trabajo fue evaluar el efecto de Bioprotection AZV-C sobre el crecimiento de la planta en distintas condiciones de reducción de fertilizante nitrogenado.

## 1.1 Objetivo General

- Determinar el efecto de Bioprotection AZV-C como complemento de la fertilización nitrogenada en el crecimiento de la planta de piña (*Ananas comosus* var. *comosus*) híbrido MD-2.

## 1.2 Objetivos Específicos

- Comparar el crecimiento de la planta de piña según dosis diferenciadas de fertilizante nitrogenado y la aplicación de Bioprotection AZV-C.
- Evaluar la población de *Azotobacter chroococcum* post aplicación de Bioprotection AZV-C en el área cultivada de piña ocupada por el ensayo.
- Determinar la mejor combinación de dosis fertilizante nitrogenado – Bioprotection AZV-C tal que estimule en la planta una tasa de crecimiento eficiente.
- Realizar un análisis de costos para determinar el impacto de modificar la dosis total fertilizante nitrogenado en piña y la adición de Bioprotection AZV-C.

## 1.3 Hipótesis de Trabajo

A pesar de las reducciones de nitrógeno en un 20%, 30%, 40% y 50% respecto a lo utilizado comercialmente por la finca en piña, la adición de Bioprotection AZV-C es capaz de mantener a la planta en una misma tasa de crecimiento respecto a la aplicación completa de nitrógeno.

## 2. REVISIÓN DE LITERATURA

### 2.1 Generalidades del cultivo

La piña es originaria de América Tropical, específicamente del norte de Brasil. Desde el punto de vista botánico es una planta de crecimiento generacional herbáceo sucesivo, monocotiledónea y de carácter perenne que tiene la capacidad de producir dos cosechas económicamente viables (Jiménez 1999).

Comúnmente es cultivada en la franja tropical y exportada mayoritariamente a países que se encuentran por encima del Trópico de Cáncer, como Estados Unidos, Holanda, Italia y España (PROCOMER 2020). Los principales encargados de abastecer el mercado mundial piñero son Costa Rica, Filipinas, Brasil, Tailandia y China (FAO 2019).

### 2.2 Descripción morfológica

#### 2.2.1 Hojas

Según Py *et al.* (1987) una planta adulta puede llegar a tener hasta 80 hojas unidas al tallo en forma de espiral o roseta. Rodríguez (2010) en su investigación de fuentes orgánicas para el crecimiento de la planta de piña logró cuantificar entre 47 y 53 hojas en los distintos tratamientos. Por otro lado, Marca (2017) reportó un máximo de 19 hojas emitidas a los 180 días después de la siembra. Fournier *et al.* (2010) realizaron muestreos de número de hojas a distintos días después de la siembra en tres variedades diferentes (MD-2, Smooth Cayenne y Flhoran 41), estos son presentados en el Cuadro 1.

**Cuadro 1.** Número de hojas determinadas en plantas de piña (n = 25) de tres variedades distintas.

Días después de siembra	Hojas en MD-2	Hojas en Smooth Cayenne	Hojas en Flihoran 41
30	30	36	41
150	42	46	59
210	49	51	62
300	56	60	74

Modificado de Fournier *et al.* (2010).

Las hojas en la planta de piña son sésiles, erectas y acanaladas como se muestra en la Figura 1; además, representan el 90% del peso de la planta durante su ciclo vegetativo y el 50% en la cercanía a la cosecha (Hanafi *et al.* 2012, Bartholomew *et al.* 2018). Dependiendo de la variedad y las condiciones climáticas pueden llegar a medir hasta 1,2 metros de largo (Jiménez 1999, Leal *et al.* 2010). Por su forma le es posible retener líquidos de hasta 50 ml en su sección axilar (Py *et al.* 1987, Jiménez 1999). Asimismo, su arquitectura permite maximizar la captura de la radiación pero al mismo tiempo mantener una ventilación fluida (Py *et al.* 1987).



**Figura 1.** Forma acanalada de una hoja de piña y los medios que le permiten almacenar agua. Tomado de DAF (2009).

Estos órganos se identifican con letras que van desde la A hasta la F según su posición en la planta, crecimiento y maduración. La hoja D se puede identificar porque es la más larga de la planta (Figura 2) y se ha demostrado que su análisis permite conocer con mayor exactitud el estado nutricional de la

planta. Esto debido a que es la hoja madura más reciente con la máxima actividad fisiológica (Ebel *et al.* 2016, Sinha *et al.* 2018).



**Figura 2.** Identificación de la hoja D en la planta de piña. Fuente: Autor.

En esta hoja también es posible cuantificar variables como el largo (cm), ancho (cm), área foliar (cm<sup>2</sup>) y su peso (g) cuando el objetivo se centra en evaluar el crecimiento de la planta de piña. En el Cuadro 2 se presenta una recopilación de resultados de investigaciones en donde cuantificaron las variables en cuestión.

**Cuadro 2.** Resultados de mediciones efectuadas en la hoja D para la evaluación del crecimiento de la planta de piña.

Variable	Resultado	Fuente
Largo (cm)	103 – 125	Fonseca (2010) y Rodríguez (2010)
Ancho (cm)	6,6 – 7,4	Fonseca (2010) y Rodríguez (2010)
Área Foliar (cm <sup>2</sup> )	63 – 153	Ebel <i>et al.</i> (2016)
Peso (g)	103 – 129	Fournier <i>et al.</i> (2010) y Rodríguez (2010)

Fuente: Elaboración propia.

### **2.2.2 Tallo**

Funciona como un reservorio de energía (transformada en almidón) cuando la fotosíntesis excede las necesidades inmediatas de la planta (DAF 2009). Bartholomew *et al.* (2018) establecen que la longitud del tallo va desde 25 cm a 50 cm, por otro lado Py *et al.* (1987) mencionan que esta no sobrepasa los 35 cm y finalmente González *et al.* (2013) encontraron una longitud máxima promedio de 10 cm a los siete meses y de 19 cm a los 18 meses.

El diámetro basal va de 2 cm a 3,5 cm, mientras que la sección superior puede alcanzar de 5 cm a 8 cm (Py *et al.* 1987 y Bartholomew *et al.* 2018). La distancia entrenudos va desde 1 mm a 10 mm según la zona de medición, sin embargo estos son visibles por las cicatrices o marcas de las hojas al ser desprendidas en su totalidad (Bartholomew *et al.* 2018).

### **2.2.3 Raíz**

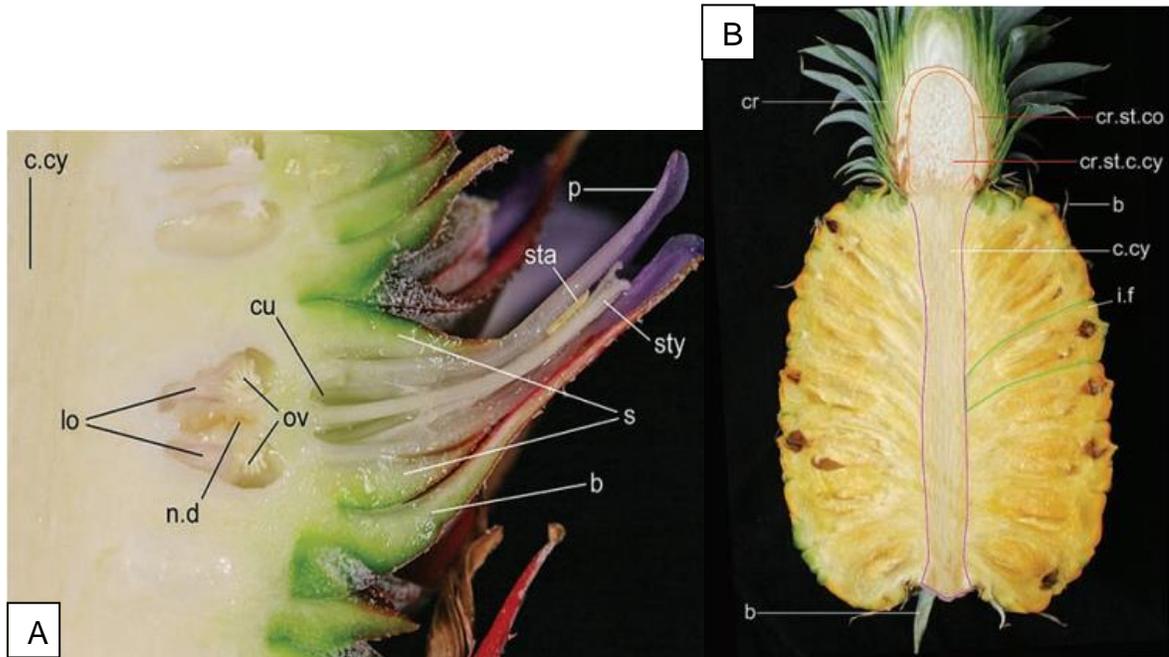
El sistema radical es relativamente superficial ya que su efectividad suele estar entre los primeros 15 cm a 30 cm del suelo (Jiménez 1999, Castañeda 2003). El número de raíces producidas está correlacionado positivamente con el peso del hijo utilizado (Bartholomew *et al.* 2018).

Si las raíces emergen de manera subterránea se convertirán en raíces principales, no obstante si estas brotan por encima del suelo se enrollarán fuertemente al tallo y serán las raíces axilares (DAF 2009). Estas raíces axilares en conjunto con la sección no clorofílica de las hojas son los puntos de mayor absorción de agua y nutrientes disueltos en ella (Py *et al.* 1987).

### **2.2.4 Inflorescencia y Fruto**

La inflorescencia (Figura 3 A) está compuesta por más de 100 flores individuales y sésiles en un arreglo de ocho espirales. Los pétalos son de color violeta y se exponen en tractos semanales desde la base hasta la futura corona (Py *et al.* 1987, Jiménez 1999, Bartholomew *et al.* 2018).

El fruto en general (Figura 3 B), es el resultado de la unión de pequeños frutículos formados por el racimo de flores. La cantidad generada es el principal factor que determinará el peso de la fruta. En este cultivo no se da la abscisión floral.

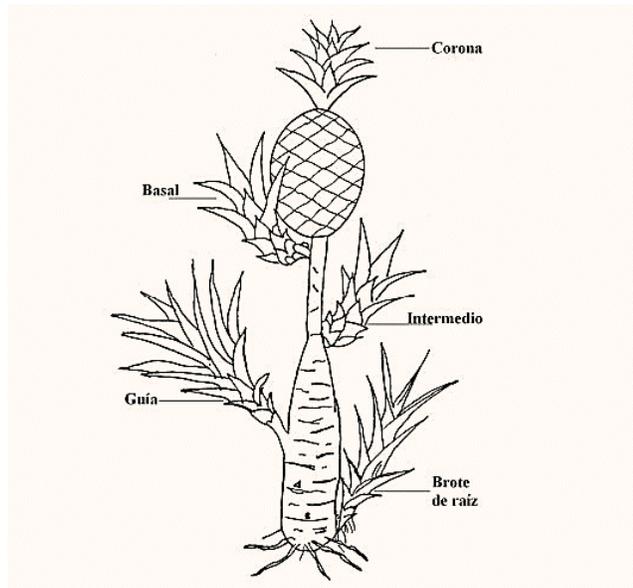


**Figura 3.** Corte longitudinal de la Inflorescencia e infrutescencia del cultivo de la piña. Simbología más relevante: A) b: bráctea. lo: lóbulo. ov: óvulos. p: pétalos. s: sépalo. sta: estambres. sty: estilo. B) cr: corona. i.f: frutículo individual. Fuente: Bartholomew *et al.* 2018.

### 2.3 Propagación de la piña

Su propagación se da de manera vegetativa (asexual) utilizando brotes o hijos que la misma planta genera posterior a la diferenciación floral, es decir, las futuras plantas serán clones de la planta madre (Py *et al.* 1987, OGTR 2008, DAF 2009).

Los hijos se diferencian según el estrato de emergencia en la planta madre. Desde la base hasta la sección superior se conocen como brote de raíz, guía, intermedio, basal y corona (Py *et al.* 1987). Cada tipo de hijo y su ubicación es presentada en la Figura 4.



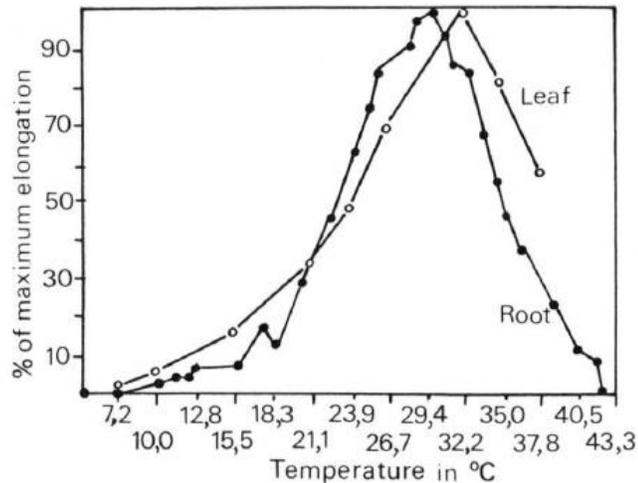
**Figura 4.** Diferentes tipos de hijos según su posición en la planta madre. Tomado de: Peña et al. 1996.

## 2.4 Requerimientos edafoclimáticos

### 2.4.1 Temperatura

Es el factor climático más limitante para la extensión de zonas productivas. Tanto la temperatura diurna como la nocturna están estrechamente ligadas al potencial de crecimiento de la planta. Si bien Reyes (1999) establece que este cultivo puede desarrollarse en un rango de temperatura media entre 20°C y 30°C, Py *et al.* (1987) van más allá y mencionan que la tasa máxima (100%) de crecimiento en las hojas se da con una temperatura de 30°C en el día y 26°C en la noche.

En la Figura 5 se presenta lo indicado por Py *et al.* (1987) respecto a la relación crecimiento – temperatura. Él indica que temperaturas inferiores a 15°C pueden provocar pérdidas en el peso de la planta. Por otro lado, cada grado centígrado extra a partir de 30°C disminuye la correlación positiva temperatura-crecimiento



**Figura 5.** Efecto de la temperatura en el crecimiento de las hojas y las raíces en el cultivo de piña. Tomado de Py et al. (1987).

### 2.4.2 Precipitación

La piña es un cultivo que no presenta elevadas necesidades hídricas y que a su vez, su desarrollo se ve afectado con los excesos. La presencia de escenarios extremos, repercutirá dos o tres meses después con la disminución del ancho y el peso de las hojas D, que durante el evento fueron las hojas más jóvenes (Py et al. 1987).

Según Reyes (1999) precipitaciones entre 1500 y 2000 mm anuales son suficientes para suplir los requerimientos de la planta. Además, su arquitectura, células (estomas y tricomas), tejidos (epidermis) y metabolismo tipo CAM le permiten recolectar, almacenar y eficientizar el uso del agua (DAF 2009).

### 2.4.3 Viento

Durante el día es el factor que mayormente influye en la regulación de la temperatura, ya que los estomas se encuentran cerrados. Sin embargo, también puede ocasionar que las hojas se rocen entre ellas y generar heridas que son aprovechadas por los microorganismos patógenos (Py et al. 1987).

#### **2.4.4 Suelo**

Debido a la pobre profundidad que alcanza la raíz, este no se vuelve un factor indispensable como sí lo es la aireación y el drenaje del terreno. El pH de la mayoría de suelos piñeros oscila entre 4,5 y 5,5 ya que según Peña *et al.* (1996) valores ajenos a dicho rango provocan disminuciones en el rendimiento. Además, debe evitarse la siembra en suelos de textura arcillosa, ya que por su granulometría se da la retención de humedad en el suelo (Reyes 1999).

#### **2.5 Nutrición de la planta**

La fertilización preforza es una práctica que está dirigida hacia promover un crecimiento en la planta que garantice el peso necesario para la inducción floral. De la fertilización resulta el estado nutricional de la planta, que puede ser cuantificado mediante análisis foliares y variables de crecimiento; o bien haciendo uso de la observación en campo (Py *et al.* 1987, Bertsch 1998, Bartholomew *et al.* 2018).

Esta es influenciada por múltiples factores como condiciones climáticas, variaciones en el suelo, técnicas empleadas, materias primas y productos comerciales adicionales. Sus ajustes dependerán del rendimiento, calidad de fruta y sus respectivos análisis históricos en la finca (Py *et al.* 1987).

En piña los elementos de mayor importancia por su alto requerimiento son el nitrógeno (N) y el potasio (K<sup>+</sup>). Su incorporación se realiza durante todo el ciclo vegetativo. Una vez iniciada la etapa reproductiva, se considera que el nitrógeno disminuye considerablemente la eficacia de la inducción floral; además, sus aplicaciones tardías alteran la calidad del fruto (Garita 2014).

En el caso del potasio, recientes investigaciones han obtenido resultados favorables en grados brix, acidez, ratio y translucidez con aplicaciones post forzamiento (Rojas 2018).

### 2.5.1 Nitrógeno

Es el elemento de mayor importancia en la fertilización preforza. Su esencialidad radica en que es el responsable de la tasa de crecimiento, ya que forma parte de las bases nitrogenadas que son sintetizadas en aminoácidos, ácidos nucleicos y proteínas necesarias para el incremento de la biomasa (Molina 2003, Aparicio-Tejo *et al.* 2013, Batholomew *et al.* 2018).

El nitrógeno es considerado un elemento altamente móvil dentro de la planta, empero, su transporte es activo por lo que requiere gasto de energía. Su asimilación en la planta se da bajo la forma oxidada nitrato ( $\text{NO}_3^-$ ) y la reducida, amonio ( $\text{NH}_4^+$ ) (Novoa y Loomis 1981, Maldonado 2013.).

La absorción de  $\text{NO}_3^-$  está influenciada por la temperatura, pH, concentración en la solución, tasa de transpiración y presencia de  $\text{NH}_4^+$ . Una vez dentro de la planta, este es reducido a  $\text{NO}_2^-$  y luego a  $\text{NH}_4^+$  mediante la nitrato reductasa y nitrito reductasa respectivamente (Novoa y Loomis 1981, Maldonado 2013.).

Cuando la planta absorbe directamente  $\text{NH}_4^+$  o lo reasimila de otros procesos metabólicos, este es transformado en glutamina y posteriormente en glutamato mediante el ciclo GS-GOGAT para que pueda ser aprovechado en la síntesis de otros aminoácidos requeridos (Maldonado 2013).

## 2.6 Análisis foliares

Es un método utilizado para estimar el contenido acumulado de cada nutriente, en una sección específica de la planta al momento del análisis. Con él se logra plasmar si la condición del tejido refleja deficiencias, excesos o un contenido óptimo de los elementos en la planta (Jones Jr y Case 1990, Bartholomew *et al.* 2018).

Para el cultivo de piña, es recomendado utilizar la hoja D por sus características ya mencionadas. Según Bartholomew *et al.* (2018) se deben recolectar entre 20 a 30 hojas D por bloque de producción en un recorrido zigzag para obtener resultados representativos.

### **2.6.1 Momento de muestreo**

Bartholomew *et al.* (2018) recomiendan realizar tres muestreos a lo largo del ciclo vegetativo. Cada uno de ellos al finalizar el tercio correspondiente del paquete tecnológico de fertilización. El tercer muestreo también es posible ejecutarlo de 4 a 6 semanas después de la inducción floral.

Pese a esto, si el costo u otras circunstancias condicionan a un único muestreo este debe concretarse al momento del forzamiento. Asimismo, estos análisis solo se justifican si el crecimiento de la planta no es limitado por otros factores (Bartholomew *et al.* 2018).

### **2.6.2 Sección de la hoja D a analizar**

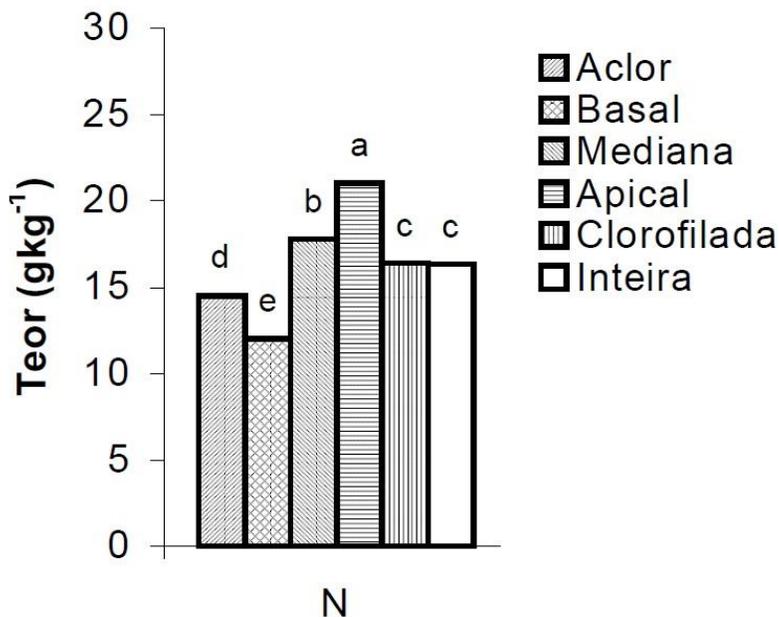
Para el análisis foliar, la hoja D sufre distintas segmentaciones según la fracción utilizada por los investigadores. Puede ser desde tercio basal (análisis costarricense), medio y apical; sección clorofílica, sección no clorofílica (análisis hawaiano) y tercio medio sección no clorofílica; porción basal más tercio medio o simplemente la hoja completa (análisis francés) (Py *et al.* 1987, Jones Jr y Case 1990, Siebeneichler *et al.* 2000, Bartholomew *et al.* 2018).

La porción a utilizar varía según la movilidad de los elementos de interés, ya que se podría subestimar su concentración real. Py *et al.* (1987) menciona que la sección no clorofílica es un área de tránsito, por lo tanto es extremadamente sensible a elementos móviles (nitrógeno, fósforo, potasio, etc.) y estos a las condiciones al momento de realizar el muestreo. Empero, la sección clorofílica es menos sensible a los escenarios que se puedan presentar.

Por otro lado Jiménez (1999), Castañeda (2003) y Garita Coto (2014) aluden que la parte basal es útil para determinar los niveles de potasio, calcio, magnesio y azufre; mientras que el segmento medio para nitrógeno, azufre e hierro.

Siebeneichler *et al.* 2000 realizaron una investigación sobre la composición mineral de la hoja D según la fracción analizada. Los resultados son presentados en la Figura 6; para el nitrógeno la mayor concentración (g/kg) se encontró en la sección apical de la hoja, mientras que la menor proporción se refleja en la

porción no clorofílica. Pese a esto concluyen que no es posible comparar las diferencias encontradas en los segmentos de la hoja.



**Figura 6.** Contenido de nitrógeno (g/kg) según la sección de la hoja D analizada. Tomado y modificado de Siebeneichler *et al.* (2000).

### 2.6.3 Contenido foliar de nitrógeno

El contenido total de nitrógeno (% o g/kg) comúnmente es expresado en términos de materia seca de la hoja D. En el Cuadro 3 se presenta una recopilación bibliográfica sobre los rangos óptimos del contenido de nitrógeno en el tejido vegetal, según cada investigador.

Existen dos metodologías principales para cuantificar el nitrógeno total presente en las hojas. Estos son el método de Kjeldahl y el método de Dumas. Según Romero (1997) este último consiste en “la pirólisis completa de la muestra y medición del contenido de nitrógeno de los gases de combustión”.

**Cuadro 3.** Contenido óptimo de nitrógeno foliar (%) según diversos autores.

Sección de la hoja	Rango óptimo de N (%)	Fuente
Hoja completa	1,5 – 1,7	Py <i>et al.</i> (1987)
Sección no clorofílica	1,5 – 2,5	Reuter y Robinson (1988)
Hoja completa	2,0 – 2,2	Malavolta <i>et al.</i> (1989)
Sección clorofílica	1,5 – 1,7	Jones Jr <i>et al.</i> (1991)
Hoja completa	2,0 – 3,0	Malavolta (1992)
Sección clorofílica	1,5 – 1,7	Boaretto <i>et al.</i> (1999)
-	1,2 – 1,7	Molina y Meléndez (2002)
Tercio Basal	1,5 – 1,8	Batholomew <i>et al.</i> (2018)
-	1,2 – 1,5	Vargas (2019) <sup>1</sup>
-	1,2 – 1,7	EARTH (s.f)

Fuente: Elaboración propia.

### 2.6.1 Deficiencias y exceso de nitrógeno

Según lo mencionado en el Cuadro 3, cualquier valor inferior o superior respecto al rango señalado por cada autor, será considerado como una deficiencia o exceso respectivamente.

La deficiencia de este elemento limita la tasa de crecimiento de la planta, reduce el largo y ancho de las hojas, así como su número. La fruta y la corona sufren un decrecimiento; además, podría no presentarse la emergencia del hijo basal o mostrar un vago desarrollo (Py *et al.* 1987, Peña *et al.* 1996, Bartholomew *et al.* 2018).

Es posible determinar deficiencias visualmente ya que se presenta una transición paulatina de un color verde oscuro a un verde pálido (clorosis). En la Figura 7 se observa la diferencia en coloración de un área que ha recibido una fertilización continua (izquierda) a otra que ha permanecido 5 semanas sin fertilización (derecha).

<sup>1</sup> Vargas, K. 02 de mayo del 2019. Análisis foliares en el cultivo de la piña (entrevista). Piedra Alegre de Pital, Costa Rica. Agroindustrial Tres Amigos S.A.



**Figura 7.** Área productiva con fertilización continua (izquierda) vs fertilización discontinua de 5 semanas (derecha). Fotografía facilitada por Mauricio Román.

Por el contrario, un exceso de nitrógeno como el presentado en la **Figura 8**, genera un color verde mate en las plantas, disminuye la respuesta a la inducción floral, genera un crecimiento excesivo que puede causar acame de las plantas, el tamaño de la corona es mayor a lo habitual excediendo la proporción respecto a la fruta y se da una deficiencia de  $K^+$  y  $Mg^{+2}$  (Peña *et al.* 1996).



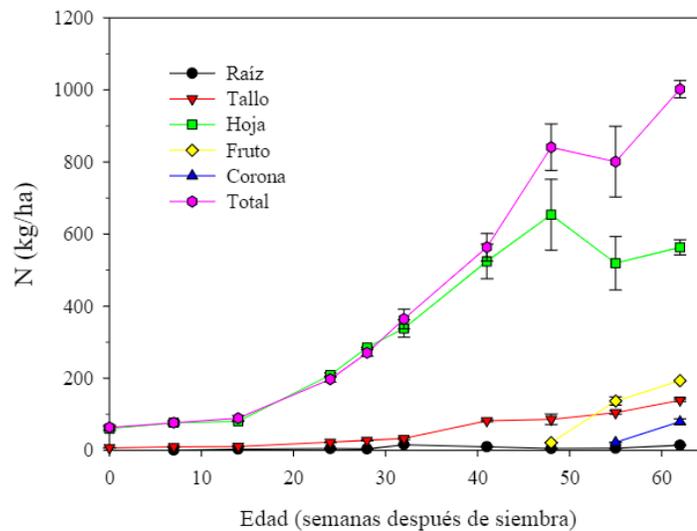
**Figura 8.** Tonalidades en las hojas de piña asociadas a exceso de nitrógeno (izquierda) y a severas deficiencias del mismo (derecha). Tomado de Bartholomew *et al.* (2018).

## 2.7 Fertilización Nitrogenada

### 2.7.1 Curva de absorción de nitrógeno

La planta de piña no es exigente en nitrógeno durante el lapso de siembra a los 4 meses. A partir de ese momento los requerimientos de este elemento incrementan de manera lineal hasta la instancia de la inducción floral (Bartholomew *et al.* 2018, Castro 2019<sup>2</sup>).

Esto concuerda con lo encontrado por Gambin y Herrera (2012) quienes demostraron que la planta tuvo una baja demanda de nitrógeno hasta las 14 semanas (3,5 meses), mientras que su máxima tasa crecimiento (demanda de nitrógeno) se expresa entre las semanas 28 y 32 después de la siembra (Figura 9).



**Figura 9.** Curva de absorción de nitrógeno en piña de primera cosecha. Tomado de Gambin y Herrera (2012).

### 2.7.2 Dosis de nitrógeno en el cultivo de piña

La cantidad total acumulada de nitrógeno a utilizar varía según el paquete tecnológico de cada sistema de producción, las condiciones edafoclimáticas,

---

<sup>2</sup> Castro, Z. 24 de abril del 2019. Momento oportuno para realizar el primer análisis de nitrógeno en piña (entrevista). Santa Clara de San Carlos, Costa Rica. Instituto Tecnológico de Costa Rica, Campus Tecnológico Local San Carlos.

densidad de siembra y rendimiento esperado. Seguidamente en el Cuadro 4 se presenta una recopilación bibliográfica de posibles dosificaciones de este elemento.

**Cuadro 4.** Dosificación total acumulada de nitrógeno para un programa de fertilización preforza según varios autores.

Vía de Aplicación	Dosis (kg/ha)	Densidad (plantas/ha)	Fuente
Foliar	500	50000	Peña <i>et al</i> (1996)
Foliar	550 - 600	65000 - 75000	Molina (2002)
Foliar	294	-	Garita (2014)
Foliar	300	48000	Marca (2017)
Foliar	700	-	Bartholomew <i>et al.</i> (2018)
Foliar	630	68000	Rojas (2019) <sup>3</sup>

Fuente: Elaboración propia.

### 2.7.3 Fertilizantes nitrogenados sintéticos

Son fabricados mediante el proceso conocido como Haber-Bosch, el cual es una fijación de nitrógeno industrial en donde el N<sub>2</sub> es reducido a amoníaco (NH<sub>3</sub>) mediante la adición de hidrógeno (H<sub>2</sub>) a una temperatura de 500 °C y una presión de 350 atm (Aparicio-Teja *et al.* 2013). A partir de este NH<sub>3</sub> líquido, se parte como base para la fabricación del 98% de fertilizantes nitrogenados (Estupiñan-Silva y Quesada 2010).

### 2.7.4 Transformaciones del nitrógeno en el suelo

Cuando se realizan aplicaciones de fertilizantes nitrogenados (nitrato y/o amonio), se llevan a cabo los procesos de nitrificación y desnitrificación (Molina y Espinosa 1999, Lucini *et al.* 2014). La primera consiste en la oxidación del NH<sub>4</sub><sup>+</sup> mediante *Nitrosomonas* sp. para formar NO<sub>2</sub><sup>-</sup>, posteriormente este compuesto es transformado en NO<sub>3</sub><sup>-</sup> a través de la bacteria *Nitrobacter* sp (Lea

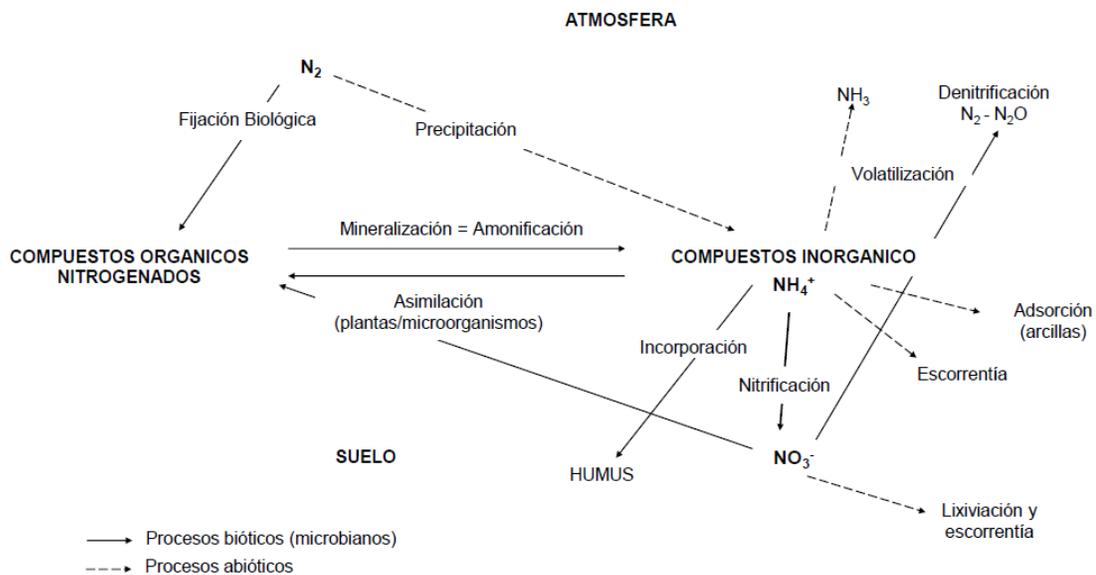
<sup>3</sup> Rojas, J. 02 de mayo del 2019. Aplicaciones totales de nitrógeno en el cultivo de la piña (entrevista). Piedra Alegre de Pital, Costa Rica. Agroindustrial Tres Amigos S.A.

1997, Molina y Espinosa 1999, Lucini *et al.* 2014). Durante la nitrificación inevitablemente se liberan cuatro átomos de  $H^+$  provocando un aumento de la acidez del suelo (Molina y Espinosa 1999).

Por otra parte, la desnitrificación es la reducción del  $NO_3^-$  a distintos compuestos nitrogenados hasta alcanzar la forma  $N_2$ . Pese a que agronómicamente la desnitrificación es un proceso negativo, desde la perspectiva ambiental resulta ser clave para la continuidad del ciclo de nitrógeno (Lucini *et al.* 2014).

La dinámica del nitrógeno es presentada esquemáticamente en la Figura 10. Estos procesos son complejos y sensibles a condiciones de temperatura, viento, humedad y pH del suelo; asimismo de la capacidad de intercambio catiónico efectivo (CICE) y la materia orgánica (Ferraris *et al.* s.f.).

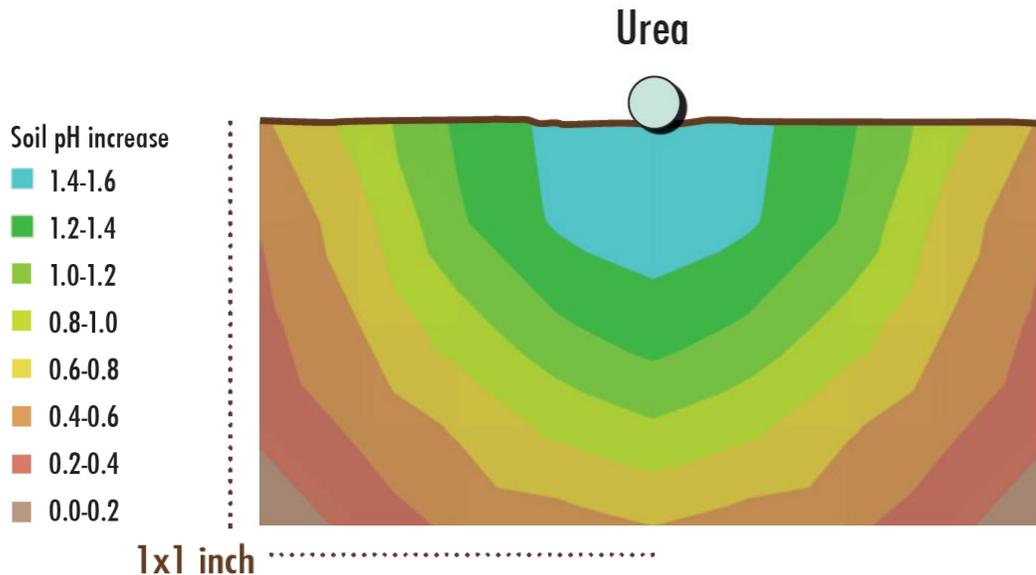
En cada etapa de las transformaciones hay pérdidas por escorrentía, lixiviación, volatización y/o adsorción. Es por esto que a nivel mundial la fertilización nitrogenada posee un rendimiento promedio del 47% (Lassaletta *et al.* 2014).



**Figura 10.** Procesos bióticos y abióticos involucrados en la dinámica del nitrógeno. Tomado de Lucini *et al.* (2014).

Al utilizar urea ocurre a una vía previa para su disponibilidad. Cuando entra en contacto con el suelo, la enzima ureasa toma el  $\text{CO}(\text{NH}_2)_2$  y lo transforma en carbamato de amonio ( $\text{H}_2\text{NCOONH}_4$ ). Esta reacción provoca que en la inmediata vecindad del gránulo de urea, se incremente el pH a valores superiores a ocho (Figura 11). En este ambiente alcalino el carbamato de amonio se descompone rápidamente en  $\text{NH}_3$  y  $\text{CO}_2$  (Molina y Espinosa 1999).

El  $\text{NH}_3$  es un gas que fácilmente se volatiliza provocando pérdidas de nitrógeno entre 5% y 70% (Molina 2003). Empero, en presencia de agua se transforma en  $\text{NH}_4^+$  permaneciendo estable en el suelo; por esta razón se debe garantizar humedad en el medio al momento de utilizar urea. Por último, el  $\text{NH}_4^+$  ya formado sufre el proceso de nitrificación mencionado anteriormente.



**Figura 11.** Incremento momentáneo del pH del suelo a partir de la aplicación de urea. Tomado y modificado de Jones *et al.* (2013).

## 2.8 Implicaciones de las fuentes sintéticas de nitrógeno

Desde la fabricación de fertilizantes nitrogenados a partir de la reacción Haber-Bosch, la producción agrícola ha percibido un incremento en el rendimiento y rentabilidad de las cosechas, sin embargo también es la responsable de causar impactos negativos en la ecología (Estupiñan-Silva y Quesada 2010).

La generación del NH<sub>3</sub> base para la elaboración de fertilizantes nitrogenados, consume entre el 1% y 2% de los suministros mundiales de energía (Estupiñan-Silva y Quesada 2010, Ludewig 2019). Asimismo, en la nitrificación y desnitrificación se generan compuestos de paso como NO<sub>2</sub><sup>-</sup>, NO y N<sub>2</sub>O que son gases de efecto invernadero. Además, este último posee un potencial de calentamiento global equivalente a 310 unidades de CO<sub>2</sub> (FAO 2015).

La lluvia ácida es atribuida en un 52% a la síntesis Haber-Bosch, en el 30% del cuerpo humano hay rastros de esta reacción, el agua sufre eutrofización y con ello la muerte de peces; además estudios indican que una concentración de nitratos superior a 25 mg/L de agua potable, genera prevalencia de cánceres (tracto digestivo, colon y recto) (Estupiñan-Silva y Quesada 2010).

La urea y los fertilizantes que contienen NH<sub>4</sub><sup>+</sup> provocan un incremento en la acidez del suelo por la nitrificación que sufren. Por esta razón se ha desarrollado el índice de acidez fisiológica, que hace referencia a los kg CaCO<sub>3</sub>/ha requeridos para compensar la acidificación del suelo por cada 100 kg del fertilizante correspondiente. En el Cuadro 5 se establece la relación fertilizante – índice de acidez fisiológica.

**Cuadro 5.** Índice de acidez fisiológica de algunos fertilizantes nitrogenados.

<b>Fuente de Nitrógeno</b>	<b>N (%)</b>	<b>Índice de Acidez Fisiológica</b>
Sulfato de amonio	21	-112
Urea	46	-84
Fosfato diamónico	18	-74
Fosfato monoamónico	12	-65
Nitrato de amonio	33,5	-63
Nitrocalcio	26	-21

Tomado y modificado de Molina (2003).

## **2.9 Búsqueda de alternativas al nitrógeno sintético**

Por lo descrito en la sección anterior, el proceso Haber-Bosch pasó de ser uno de los descubrimientos más vanagloriados, a catalogarse como una amenaza para

la salud humana en el año 2010 por The European Nitrogen Assessment (Estupiñan-Silva y Quesada 2010).

Es por esto que en vías de generar una producción más sostenible, los sistemas productivos actuales deben implementar alternativas biológicas capaces de reducir la dependencia hacia los productos sintéticos. Se han realizado investigaciones en donde implementan fuentes como harina de sangre, harina de pescado, Terrafert® (queratinas) y compostajes (Rodríguez 2010, Marca 2017).

Sin embargo, las fuentes alternativas no se deben limitar únicamente al origen animal o vegetal, también existen microorganismos capaces de fijar y solubilizar nutrientes en el suelo para disposición de la planta. Estos reciben el nombre de biofertilizantes (Picado 2010).

### **2.9.1 Biofertilizantes**

Los biofertilizantes son preparaciones orgánicas que contienen microorganismos vivos como bacterias y hongos (o su mezcla) que colonizan la rizosfera. Sus funciones están dirigidas mayormente a la fertilización de los cultivos, particularmente incrementando la disponibilidad de nitrógeno y fósforo (Tomer *et al.* 2016, Wani *et al.* 2016, Kumar 2019). Algunos microorganismos y su función son presentados en el Cuadro 6.

Asimismo, se ha detallado que poseen otros mecanismos que promueven el crecimiento de las plantas como la producción de hormonas y sustancias contra fitopatógenos (Sivasakthi *et al.* 2017, Kumar 2019). Entre estos microorganismos resaltan diversos géneros de bacterias que son llamadas Rizobacterias Promotoras del Crecimiento de las Plantas o PGPR por sus siglas en inglés (Tomer *et al.* 2016).

**Cuadro 6.** Biofertilizantes utilizados en la agricultura para incrementar el crecimiento de los cultivos.

<b>Biofertilizante</b>	<b>Función</b>	<b>Condición en el suelo</b>
<i>Azotobacter</i> sp.	Fijación de N <sub>2</sub>	Vida libre
<i>Rhizobium</i> sp.	Facilitar N y P	Simbiosis
<i>Bacillus subtilis</i>	Solubilización de P	Vida libre
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	Control Patógenos	Vida libre
<i>Trichoderma harzianum</i>	Facilitar N y P	Vida libre
<i>Bradyrhizobium</i> sp.	Fijación de N <sub>2</sub>	Simbiosis
<i>Klebsiella</i> sp.	Fijación de N <sub>2</sub>	Vida libre

Tomado y modificado de Aparecio-Tejo *et al.* 2013, Pérez Álvarez *et al.* 2015, Tomer *et al.* 2016.

### **2.9.2 Rizobacterias promotoras del crecimiento en plantas (PGPR)**

Como su nombre lo indica, son bacterias que colonizan la rizosfera y ejercen un rol directo e indirecto sobre el crecimiento de las plantas. La rizosfera propiamente es la zona donde se encuentra el mayor volumen de raíces, por lo que en el caso de la piña se denota en los primeros 15 cm (Castañeda 2003, Tomer *et al.* 2016, Sivasakthi *et al.* 2017).

Las rizobacterias necesitan compuestos químicos para poder colonizar y ejecutar sus funciones, estos generalmente provienen de secreciones que realiza la misma planta a través de la raíz (Tomer *et al.* 2016, Sivasakthi *et al.* 2017). Algunos de estos compuestos emitidos por las plantas son mostrados en el Cuadro 7.

Dentro de las rizobacterias se pueden mencionar las bacterias del género *Azotobacter* sp. (*A. vinelandii*, *A. choroococcum*, *A. beijerinckii*, *A. armeniacus*, *A. salinestris*) (Sung Gee *et al.* 1990, Picado Rojas 2010, Kumari *et al.* 2017).

**Cuadro 7.** Compuestos químicos que son exudados por la planta a través de su raíz y aprovechados por las rizobacterias.

Tipo de Estructura	Compuestos Químicos
Aminoácidos	Alanina, cisteína, glutamato, leucina, fenilalanina, serina, prolina, triptófano.
Ácidos orgánicos	Ácido acético, ácido butírico, ácido cítrico, ácido glutámico, ácido pirúvico.
Azúcares	Galactosa, glucosa, fructuosa, maltosa, rafinosa.
Vitaminas	Biotina, niacina, riboflavina, tiamina.
Enzimas	Amilasa, alcalino fosfatasa, proteasa.
Iones inorgánicos	H <sup>+</sup> , OH <sup>-</sup> , HCO <sub>3</sub> <sup>-</sup>
Gases moleculares	CO <sub>2</sub> , H <sub>2</sub>

Tomado y modificado de Tomer *et al.* 2016.

### 2.10 *Azotobacter* sp.

El género *Azotobacter* fue descrito por primera vez en 1901 por Martinus Beijerinck. Son organismos diazótrofos (di=dos; azoto=nitrógeno; trofo=comer), aeróbicos obligados, de vida libre y se encuentran distribuidos a nivel mundial (Lucini *et al.* 2014, Noar y Bruno-Bárcena 2018, Kumar 2019). Las principales especies son *A. chroococcum* y *A. vinelandii*; ambas descubiertas en el año 1901 y 1903 respectivamente (Kumari *et al.* 2017).

A continuación se presenta la clasificación taxonómica de *Azotobacter* sp:

Reino: Bacteria

Phylum: Proteobacteria

Clase: Gammaproteobacteria

Orden: Pseudomonas

Familia: Pseudomonadaceae/Azotobacteriaceae

Género: *Azotobacter*

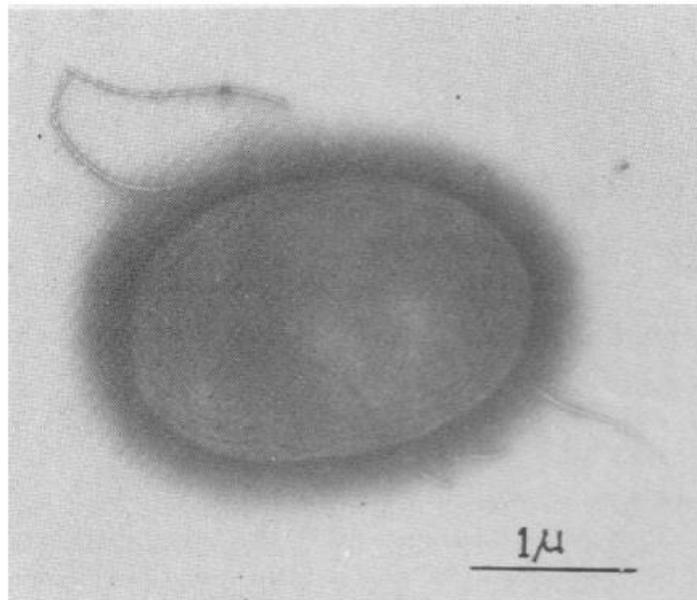
Fuente: Wani *et al.* (2016).

### 2.10.1 Morfología de *Azotobacter* sp.

Su forma es presentada en la Figura 12, esta varía entre ovalada a esférica, con un largo de 2  $\mu\text{m}$  a 10  $\mu\text{m}$  y un ancho de 1  $\mu\text{m}$  a 3  $\mu\text{m}$  (Kumar 2019). Puede desplazarse gracias a los flagelos presentes en su superficie, sin embargo al momento de encapsularse pierde su movilidad. En este momento adapta una forma esférica y produce una abundante capa de moco que protege la célula (Wani *et al.* 2016, Kumari *et al.* 2017).

Este encapsulamiento obedece a la formación de quistes, que es una forma de reproducción vegetativa y de protección. Su tiempo de germinación entre 4 y 6 horas si las condiciones le favorecen, esto permite una pronta colonización en la rizosfera (Kumari *et al.* 2017).

El quiste le ofrece ventajas como resistencia a la desecación, radiación solar y rayos gamma. Posee el doble de resistencia ante los rayos UV que una célula vegetal; no obstante su debilidad se presenta ante el incremento de las temperaturas (Wani *et al.* 2016, Kumari *et al.* 2017).



**Figura 12.** Fotografía de *Azotobacter* sp. mediante microscopio de barrido electrónico. Tomado de Kumari Das 2019.

## **2.11 Condiciones para el desarrollo de *Azotobacter* sp.**

### **2.11.1 Temperatura**

Según Wani *et al.* (2016) estas bacterias tienen un óptimo desarrollo cuando la temperatura oscila entre 20°C y 30°C. Dilworth *et al.* (1988) mantuvieron la bacteria durante 15 minutos a 39°C y esta continuó su actividad enzimática, aunque a una menor eficiencia.

### **2.11.2 pH del suelo**

Mahato y Kafle (2018) mencionan que su desarrollo puede darse entre 4,8 y 8,5. Por su parte, Dilworth *et al.* (1988) indican que el pico de formación de productos se da con un pH de 7,0 y 7,5; Wani *et al.* (2016) señalan que esta condición es propicia entre 6,5 y 7,5 y su funcionamiento va decreciendo conforme el pH se torna más ácido. No obstante, Obregón (2019)<sup>4</sup> establece que a un pH de 4 la bacteria todavía ejerce sus funciones.

### **2.11.3 Conductividad eléctrica (CE)**

En suelo la bacteria no reporta inconvenientes con medidas de hasta 0,52 dS/m y valores inferiores a este (Borda-Molina *et al.* 2011, Sánchez-López *et al.* 2019, Shirinbayan *et al.* 2019). Igualmente, en medios líquidos este microorganismo ha sido utilizado para la remediación de aguas residuales con una CE de 15 mS/cm brindando resultados satisfactorios (Ehaliotis *et al.* 1999).

### **2.11.4 Productos fitosanitarios (Plaguicidas)**

Este microorganismo por su naturaleza no debe ser mezclado con bactericidas. Rivera *et al.* (2010) reportan que los ingredientes activos carboxin, tiram, imidacloprid, S-metolachloro, fluometuron y glifosato no afectan la población de *A. chroococcum*, mientras que la cipermetrina sí lo hace.

---

<sup>4</sup> Obregón, M. 02 de mayo del 2019. Condiciones edáficas para el desarrollo de *Azotobacter* sp. (entrevista). Piedra Alegre de Pital, San Carlos. Propietario de Laboratorios Doctor Obregón.

Shahid *et al.* (2019) mencionan que la atrazina y monocrotofos disminuyen un 39% la producción de auxinas por parte de *A. chroococcum*. Kitazin, metalaxyl, hexaconazole, glifosato, quizalofop, atrazina, fipronil, monocrotofos e imidacloprid no afectan este proceso, ni la solubilización de fósforo, creación de sideróforos y generación de NH<sub>3</sub>.

## **2.12 Población de *Azotobacter* sp**

Se cuantifica mediante las Unidades Formadoras de Colonias (UFC) por unidad de peso o volumen de la muestra. Las UFC reportadas son equivalentes al número de bacterias presentes en el suelo. Según Wani *et al.* (2016) en la rizosfera de suelos no cultivados la población de *Azotobacter* sp. suele ser mínima por lo expuesto en el Cuadro 7.

Asimismo, la densidad de bacterias disminuye conforme se profundiza en los horizontes del suelo. Córdova-Bautista *et al.* (2009) determinaron el mayor conteo poblacional entre los 2 cm y 19 cm de profundidad. Inclusive, hallaron  $11 \times 10^2$  UFC/g a los 70 cm – 110 cm de calado.

## **2.13 Beneficios de *Azotobacter* sp. en el crecimiento de las plantas**

### **2.13.1 Producción de Hormonas**

*Azotobacter* sp. es capaz de producir auxinas, específicamente ácido indol acético (IAA). Esta hormona estimula la división, expansión y diferenciación celular en las plantas; en el caso de la piña el beneficio se materializa en la elongación de la raíz. *Azotobacter* sp. es capaz de generar hasta 33.28 µg IAA/ml (Chennappa *et al.* 2019). Además, cuando en el medio se encuentra triptófano (precursor de IIA) su producción se incrementa en un 45% y 50% (Kumar 2019).

Asimismo, se ha constatado la elaboración de giberelinas, explícitamente ácido giberélico (GA). Esta hormona beneficia principalmente los procesos de germinación, floración y división celular (Chennappa *et al.* 2019). Kumar (2019) reporta una fabricación máxima de 0,1 µg GA<sub>3</sub>/ml.

### **2.13.2 Solubilización de fosfatos**

*Azotobacter* sp. tiene la capacidad de biotransformar los fosfatos insolubles, a formas de fósforo soluble y disponible para la planta (Chennappa *et al.* 2019). En la investigación realizada por Shirinbayan *et al.* (2019) las cepas Az63 y Az70 fueron capaces de solubilizar 133,3 µg de fosfato/ml de solución con fosfato de calcio y 117,7 µg de fosfato/ml de solución con fosfato de calcio respectivamente.

### **2.13.3 Reducir o suprimir el efecto de plagas**

Se ha reportado a *Azotobacter* sp. como un supresor de la afectación ocasionada por los hongos *Rhizoctonia solani*, *Peronospora arborescens*, *Sclerotium* sp., *Fusarium* sp., *Cephalosporium maydis*, *Alternaria brassicola*, *Colletotrichum falcatum*, *Curvularia* sp., *Helminthosporium* sp. y *Aspergillus* sp. (Chennappa *et al.* 2019; Kumar 2019).

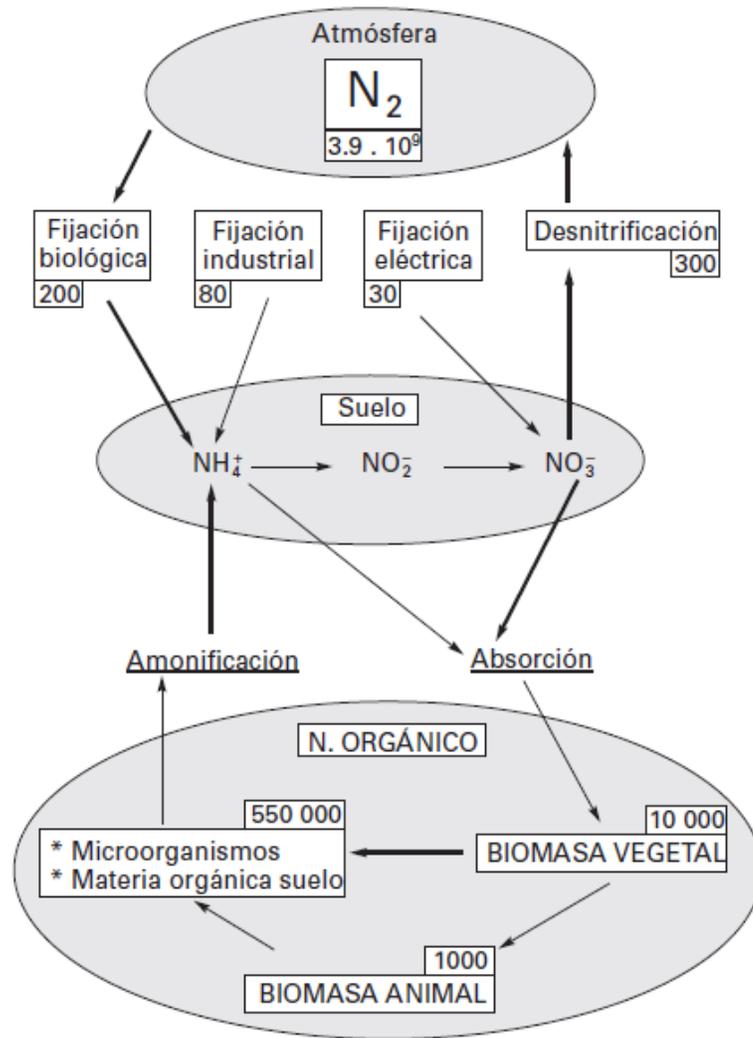
A su vez, posee la capacidad de inhibir la eclosión de huevos de *Meloidogyne incognita*, *Spodoptera litura*, *Spilarctia obliqua* y *Corcyra cephalonica* (Kumar 2019).

### **2.13.4 Fijación biológica de nitrógeno (FBN)**

Es el proceso mediante el cual el nitrógeno molecular (N<sub>2</sub>) que no puede ser aprovechado por las plantas, se transforma mediante la enzima nitrogenasa a compuestos asimilables. Anualmente se fijan 380 tetragramos de nitrógeno (Tg N/año) y según Tomer *et al.* (2016) la FBN se encarga del 50% de nitrógeno fijado/año; sin embargo, Geddes y Oresnik 2016 afirman que este proceso aporta el 60% (230 Tg N/año) del total fijado.

Además de la FBN existen otras rutas para la incorporación del nitrógeno atmosférico a la biología de las plantas, pero principalmente se menciona la atmosférica (relámpagos) con 5 Tg N/año (≈1%) y la industrial (proceso Haber-Bosch) con 121 Tg N/año (≈32%) (Geddes y Oresnik 2016).

Independientemente del proceso llevado a cabo, todos dependen del ciclo del nitrógeno el cual es presentado en Figura 13.



**Figura 13.** Representación esquemática del ciclo de nitrógeno (cifras en millones de toneladas métricas). Tomado de Aparicio-Tejo *et al.* (2013).

## 2.14 Enzima nitrogenasa

Es la encargada de llevar a cabo la FBN, según Newton (2007) existen cuatro tipos de nitrogenasa (Nasa), de las cuales tres son las más detalladas. La principal tiene como base el molibdeno (Mo-nitrogenasa); las otras dos se consideran alternativas y las acompañan el vanadio (V-nitrogenasa) y hierro (Fe-nitrogenasa).

*Azotobacter chroococcum* posee Mo-nitrogenasa y V-nitrogenasa; mientras que la especie *A. vinelandii* alberga los tres tipos descritos. El orden jerárquico de funcionamiento es Mo-Nasa, V-Nasa, Fe-Nasa y este depende de la disponibilidad del elemento acompañante (Lea 1997).

## 2.15 Molibdeno nitrogenasa

Está compuesta por dos unidades, ambas son sulfo-ferro-proteínas que difieren en función y composición química. La unidad II (KP II) o dinitrogenasa reductasa, se representa como Fe-proteína y su función es la de transportar electrones ( $e^-$ ) hacia la unidad I. Por su parte, la unidad I (KP I) o dinitrogenasa, además los átomos de hierro y azufre, contiene molibdeno, por lo que su representación es Fe-Mo-proteína y se encarga de la ruptura del triple enlace del nitrógeno molecular ( $N\equiv N$ ) (Lucini *et al.* 2014).

## 2.16 Mecanismo de fijación biológica de nitrógeno

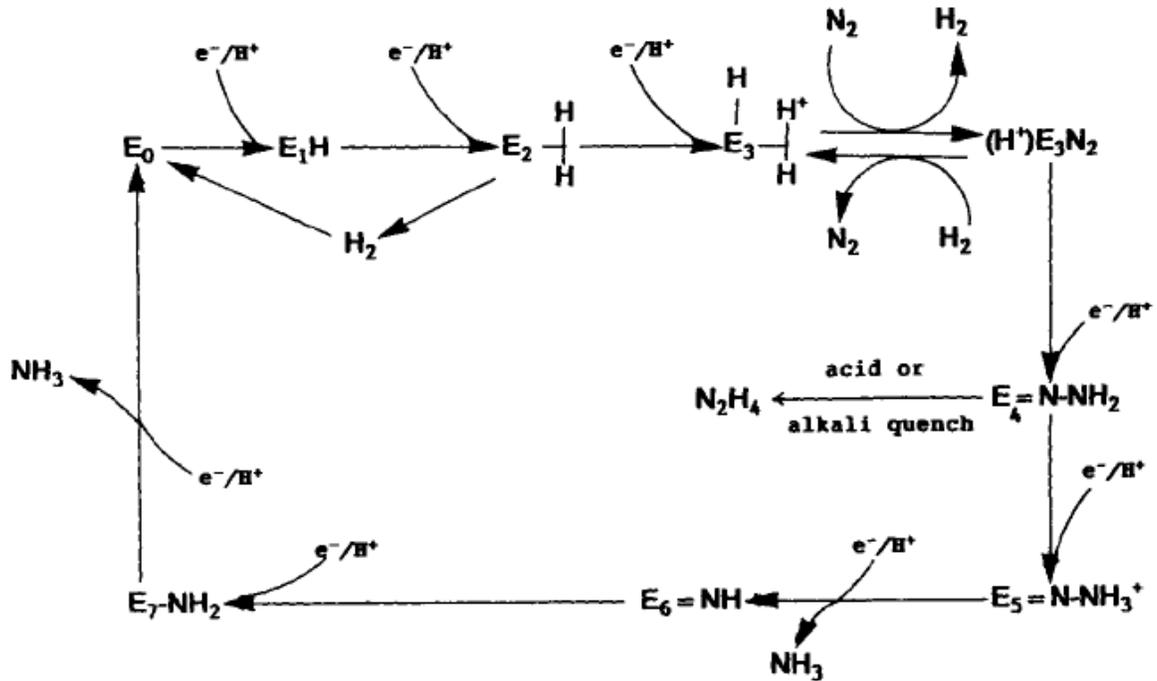
Se realiza por la interacción del ciclo que cumple cada unidad. La unidad II capta un electrón que es donado por la proteína ferredoxina, esto le permite aprehender dos moléculas de  $ATP \cdot Mg^{+2}$ , dando la posibilidad de acoplarse a la unidad I. Para transferir el electrón, es necesaria la hidrólisis de ATP a ADP, liberando fósforo inorgánico ( $P_i$ ). En ese momento, se da la separación de las unidades y la KP II se desprende del  $Mg^{+2}$  y  $ADP + P_i$  para dar inicio a un nuevo ciclo (Aparicio-Tejo *et al.* 2013, Lucini *et al.* 2014, Geddes y Oresnik 2016, Kumar 2019).

Por su parte, la KP I necesita enlazar el  $N_2$  al Mo de su estructura para efectuar el proceso. Esta unidad requiere un total de ocho electrones para completar la reducción de  $N_2$  a los dos moles del producto final, por lo que el ciclo de la KP II se realiza dicha cantidad de veces. La KP I al momento de recibir el tercer electrón, da inicio al proceso de adicionar electrones y  $H^+$  al nitrógeno molecular (Lea 1997, Newton 2007, Aparicio-Tejo *et al.* 2013, Lucini *et al.* 2014).

Es importante señalar que dos de los ocho electrones son utilizados para formar  $H_2$ ; mismo que se considera innecesario, por lo tanto se disminuye la

eficiencia del proceso. Aparicio-Tejo *et al.* (2013) mencionan que entre el 40% y 70% de los electrones que ingresan a la nitrogenasa se “pierden” en la producción de H<sub>2</sub>.

El ciclo KP I es representado en el diagrama de la Figura 14, en donde se simboliza como “E” con un subíndice que indica el número de electrones proporcionados por la KP II.



**Figura 14.** Ciclo de catálisis para la reducción del N<sub>2</sub> realizado por la unidad I de la enzima nitrogenasa. Tomado de Lea (1997).

Respecto a la ecuación química que interpreta a este proceso, existe una leve variante en el producto final según el autor de referencia. Se menciona que de este proceso resultan dos moles de NH<sub>3</sub> [1], mientras otros establecen que son dos moles de NH<sub>4</sub><sup>+</sup> [2].



[1] (Lea 1997, Newton 2007, Zehr y Montoya 2007, Geddes y Oresnik 2016, Jiménez-Vicente *et al.* 2018, Noar y Bruno-Bárcena 2018, Kumar 2019).



[2] (Halbleib y Ludden 2000, Aparicio-Tejo *et al.* 2013, Lucini *et al.* 2014).

Para *A. chroococcum* la FBN es un proceso metabólico para la obtención de  $\text{NH}_4^+$  que es utilizado para formar el aminoácido glutamato. Según Chaves (2020)<sup>5</sup> las bacterias dizótrofas acumulan aminoácidos y cuando mueren, la mineralización del suelo a través de la enzima glutamato deshidrogenasa, descompone dicho compuesto, liberando los iones  $\text{NH}_4^+$  al suelo y así ser aprovechados por las plantas (Coyne 2000).

De manera *in vitro* se ha determinado que *Azotobacter* sp. puede fijar 10 mg N por gramo de fuente de carbono, o bien, 10  $\mu\text{g}$  N por gramo de glucosa consumido (Wani *et al.* 2016, Mahato y Kafle 2018). En sistemas de producción agrícola se menciona que puede fijar hasta 20 kg N/ha/año (Wani *et al.* 2016, Kumari *et al.* 2017, Sivasakthi *et al.* 2017, Mahato y Kafle 2018), sin embargo no se especifica la población de bacterias ni las condiciones bajo las cuales se lograría materializar dicho supuesto.

## **2.17 Condiciones que afectan mayormente la FBN**

### **2.17.1 Oxígeno**

A pesar de ser un organismo aeróbico obligado, el oxígeno es el factor más antagonista para la FBN. Su presencia atrae el electrón proveído por la ferredoxina, lo que paraliza el ciclo KP II – KP I (Lucini *et al.* 2014).

Ante esto, la bacteria ha desarrollado estrategias que le permiten proteger la nitrogenasa. El primer mecanismo recibe el nombre de Protección Respiratoria, este consiste en incrementar la tasa de respiración celular mediante la enzima citrato sintasa y citrocromo *d*, el cual transforma el  $\text{O}_2$  a  $\text{H}_2\text{O}$  (Soto-Urzúa y Baca 2001, Kumar 2019).

Otra estrategia es la Protección Conformacional, en la cual se unen proteínas a la nitrogenasa formando una especie de escudo que la protege (Kumar 2019).

---

<sup>5</sup> Chaves Alfaro, JG. 21 de mayo del 2020. Proceso de fijación biológica de nitrógeno y su aprovechamiento por las plantas (entrevista). Santa Clara, San Carlos. Tecnológico de Costa Rica, Campus Tecnológico Local San Carlos.

Una de esas proteínas se ha identificado como Shethna, según Soto-Urzúa y Baca (2001) aún se desconoce su función específica, pero se cree que desvía el flujo de electrones.

Una tercer vía es la Autoprotección, en esta la propia nitrogenasa mediante la Fe-proteína·MgADP reduce el O<sub>2</sub> a súper óxido (O<sub>2</sub><sup>-</sup>) o a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> que son eliminados por la catalasa y superóxido dismutasa (Soto-Urzúa y Baca 2001).

### **2.17.1 Nitrógeno amoniacal**

Kumari *et al.* (2017) mencionan que la presencia de nitrógeno disponible disminuye la FBN por parte de *Azotobacter* sp. Esto se da porque la bacteria capta el NH<sub>4</sub><sup>+</sup> externo y lo incorpora a la formación de glutamato como una forma de evitar el gasto energético que conlleva obtener el mismo NH<sub>4</sub><sup>+</sup> mediante la FBN (Lucini *et al.* 2014).

Sin embargo esto no quiere decir que no puedan ser utilizadas como complemento en la fertilización, ya que la probabilidad de que la bacteria por sí misma pueda satisfacer la demanda nitrogenada de una planta, es prácticamente nula.

Según los resultados obtenidos en diversos ensayos, parece ser que la relación óptima ronda el 80% fertilizante nitrogenado + *Azotobacter* sp (Lozada y Rivas 2010, Sánchez-López *et al.* 2018; Sánchez-López *et al.* 2019). En la investigación de Subedi *et al.* (2019) se obtuvieron mejores resultados al combinar el 100% de nitrógeno + *Aztobacter* sp, respecto al tratamiento con misma dosis pero sin inoculación.

## **3. MATERIALES Y MÉTODOS**

### **3.1 Ubicación del estudio**

La finca Agroindustrial Tres Amigos S.A., se encuentra ubicada en el pueblo de Piedra Alegre del distrito de Pital, perteneciente al cantón de San Carlos de la provincia de Alajuela en Costa Rica. Sus coordenadas en el sistema geográfico son 10°55'81" latitud norte y -84°31' 72" longitud oeste.

### **3.2 Época**

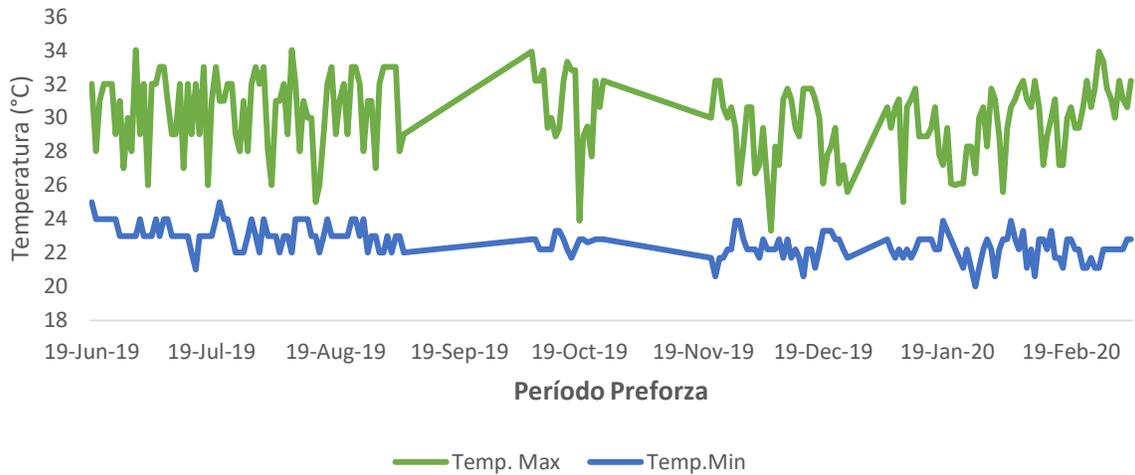
El estudio se desarrolló durante la época lluviosa y parte de la época de pocas lluvias en Costa Rica, las cuales se extienden desde mayo a noviembre y de diciembre a abril respectivamente.

La investigación dio inicio en el 19 de junio del 2019 con la siembra del material vegetal y finalizó el 3 de marzo del 2020 con el proceso de inducción floral mediante etileno y carbón activado.

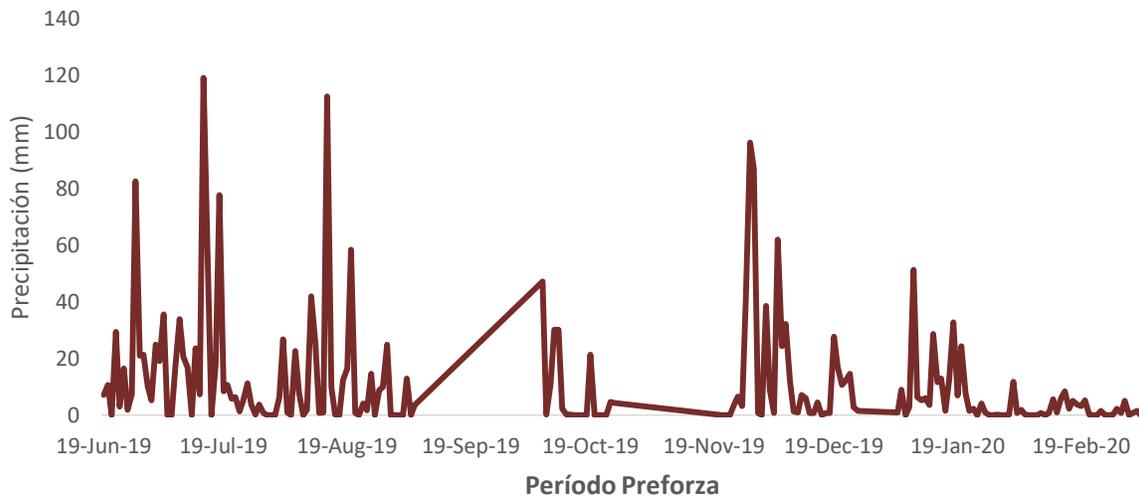
#### **3.2.1 Condiciones ambientales**

Agroindustrial Tres Amigos S.A., cuenta con un registro de las condiciones climáticas a partir de noviembre del año 2011. Desde dicha fecha hasta el momento previo de la investigación se registró un rango de temperatura promedio (mínima – máxima) que va 22,23 °C a 30,37 °C; asimismo una humedad relativa promedio (mínima – máxima) de 71,98 % a 95,35 % y finalmente una precipitación anual acumulada promedio de 2845 mm.

En la Figura 15 y Figura 16 se presentan los datos climáticos de temperatura y precipitación durante el momento del ensayo. La temperatura mínima promedio fue de 22,6°C, mientras que la máxima promedio 30°C. Por otra parte se registró una precipitación acumulada de 2155 mm.



**Figura 15.** Comportamiento de la temperatura (°C) máxima y mínima durante el período preforza de la plantación. Nota: El comportamiento atípico entre los meses septiembre, octubre y noviembre obedecen a un desperfecto de la estación climática.



**Figura 16.** Comportamiento de la precipitación (mm) durante el período preforza de la plantación. Nota: El comportamiento atípico entre los meses septiembre, octubre y noviembre obedecen a un desperfecto en la estación climática.

### 3.3 Material de estudio

La empresa Agroindustrial Tres Amigos S.A. utiliza el híbrido MD-2 para su producción y exportación de fruta fresca. Este es sembrado bajo el sistema tres bolillos a 26,70 cm (10,5 in) entre plantas, en camas con 1,10 m de centro a centro.

Con esto se obtienen densidades de siembra de 68.000 plantas/ha. El material utilizado en la investigación proviene de un tipo de hijo guía recortado con un rango de peso entre 401 g – 600 g.

### 3.4 Área y unidad muestral

La investigación tuvo lugar en el bloque 35 del lote 20. El área experimental fue de 1584 m<sup>2</sup>, compuesta por 16 camas de siembra a lo ancho y 90 m de largo. Esta área fue particionada longitudinalmente y transversalmente a la mitad para así obtener cuatro bloques experimentales, donde se distribuyeron las unidades muestrales.

En total se establecieron 20 unidades muestrales (cinco por cada uno de los cuatro bloques) de 79,2 m<sup>2</sup> cada una, compuestas de ocho camas a lo ancho y 9 m de largo, con una población de aproximadamente 539 plantas.

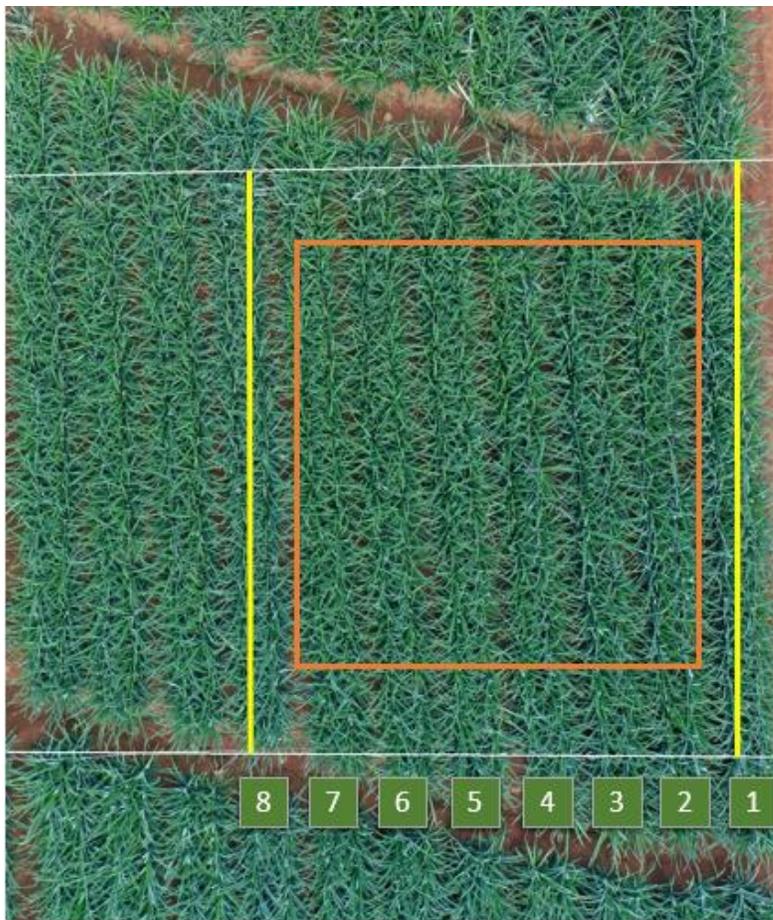


**Figura 17.** Demarcación del bloque utilizado para la distribución del área experimental, Agroindustrial Tres Amigos S.A, Pital, 2020.

#### 3.4.1 Parcela útil

Para cada unidad muestral se diseñó una parcela útil con el fin de evaluar únicamente las unidades observacionales dentro de ella. Como borde se fijó la primera y última cama de siembra, además de 1,5 m en ambos extremos

longitudinales como barrera para la deriva. Por lo que esta área contó con 39,5 m<sup>2</sup> y una población promedio de 270 plantas. En la Figura 18 se muestra el número de cama y el área de evaluación enmarcada con color anaranjado.



**Figura 18.** Representación gráfica de la unidad muestral y parcela útil de cada uno de los tratamientos mediante fotografía aérea, Agroindustrial Tres Amigos S.A, Pital, 2020. Fotografía facilitada por Mauricio Román y editada por el autor.

### 3.5 Descripción de tratamientos

Se evaluaron cuatro tratamientos con reducciones de fertilizante nitrogenado durante los primeros seis ciclos de fertilización preforza, además de un testigo que correspondió a la dosificación comercial empleada por la finca. La dosis de cada tratamiento se determinó mediante una reducción porcentual en un rango amplio del 20%, 30%, 40% y 50% respecto al testigo. A excepción de este, en

los demás tratamientos se incorporó el producto Bioprotection AZV-C para la validación del proceso de fijación de nitrógeno (Cuadro 8).

**Cuadro 8.** Descripción de los tratamientos utilizados para la evaluación del producto Bioprotection AZV-C como fijador de nitrógeno, Agroindustrial Tres Amigos S.A., Pital, 2019.

Tratamiento	Descripción	Dosis total paquete preforza (kg N/ha)
1	Testigo	533,6
2	Reducción 20% + Bioprotection	492,2*
3	Reducción 30% + Bioprotection	471,5*
4	Reducción 40% + Bioprotection	450,8*
5	Reducción 50% + Bioprotection	430,1*

\*Las reducciones porcentuales se realizaron únicamente para los primeros seis ciclos de fertilización, es por esto que no son proporcionales al acumulado final del testigo (kg/ha).

### 3.5.1 Descripción de Bioprotection AZV-C

Bioprotection AZV-C es un biopreparado propiedad de Laboratorios Dr. Obregón que está compuesto por la bacteria fijadora de nitrógeno *Azotobacter chroococcum* a una concentración de  $4,4 \times 10^6$  UFC/ml. La dosis recomendada es de 11,34 L (3 gal) a 18,9 L (5 galones) diluidos en 200 L/ha a 600 L/ha según el cultivo a aplicar.

### 3.6 Preparación de los tratamientos

En cada uno de los ciclos de fertilización, la preparación de los tratamientos se realizó bajo las condiciones, lineamientos e instrumentos de la bodega de Agroindustrial Tres Amigos S.A (Figura 19). Las dosis de los productos comerciales y fórmulas utilizadas por la finca fueron ajustadas para un volumen de aplicación de 20 L.

La reducción porcentual del nitrógeno se calculó a partir de la proporción peso/volumen (%P/V) de urea en 1 L de agua para el testigo. A dicha concentración se le descontó el porcentaje correspondiente para cada uno de los tratamientos (Cuadro 9).

El producto Bioprotection AZV-C se incorporó en cuatro de los seis ciclos con reducción nitrogenada (Cuadro 10). La dosis utilizada fue de 90 ml (12 L/ha) y esta se adicionó a los respectivos tratamientos al momento de salir al campo para la aplicación de los mismos.

**Cuadro 9.** Ejemplo de la reducción de nitrógeno en la preparación de cada uno de los tratamientos, Agroindustrial Tres Amigos S.A., Pital, 2020.

Ciclo	Concentración Testigo (g/L)	Reducción (%)	Dosis Urea (g)
X	100	20	80
		30	70
		40	60
		50	50

Adicionalmente se evaluó la conductividad eléctrica (mS/cm) y el pH en una repetición al azar de cada tratamiento. Para ello se utilizó un conductímetro digital marca OAKLON, modelo CON610 y un peachímetro digital marca Thermo Scientific, modelo ORION. Ambos equipos fueron calibrados previamente a su utilización.



**Figura 19.** Sitio, instrumentos y envases utilizados para la preparación de los tratamientos en los ciclos de aplicación, Agroindustrial Tres Amigos S.A., Pital, 2019.

### 3.7 Aplicación de los tratamientos

Los tratamientos con la reducción de nitrógeno fueron aplicados durante los primeros seis ciclos de fertilización (Cuadro 10) haciendo uso de una motobomba marca Carpi, modelo CPC-25, a la cual se le enlazó un brazo aspersor con un ancho de trabajo de 4 m, compuesto por 14 boquillas marca TeeJet, punta TX-VK6 de cerámica, espaciadas 28,5 cm entre sí, con una descarga aproximada de 0,35 l/min (0,1 gal/min) cada una. La aspersion de cada repetición tardó entre 4 min a 4,5 min, por lo que la velocidad de avance fue de aproximadamente 4,2 m/min a una presión de trabajo alrededor de 3 bar (43,5 psi).



**Figura 20.** Metodología de aplicación empleada desde el ciclo uno hasta el ciclo seis en las repeticiones de los distintos tratamientos, Agroindustrial Tres Amigos S.A., Pital, 2019.

A partir del séptimo hasta el décimo tercer ciclo de fertilización, la finca continuó con las aplicaciones de su paquete comercial haciendo uso de un spray boom con dos brazos aspersores mecánicos (Anexo 2). Cada uno posee 16,8 m de largo, está compuesto por 59 boquillas con disco y núcleo de cerámica, espaciadas 30 cm entre sí y calibradas para asperjar 2650 L/ha a una presión de 50 psi. Este equipo es halado por un tractor marca Landini Landpower, modelo 165 TT, que circula a 20 km/h en marcha tortuga 4, a 1800 rpm.

**Cuadro 10.** Cronograma de aplicaciones de los ciclos de fertilización en el bloque 35 del lote 20, Agroindustrial Tres Amigos S.A., Pital, 2020.

Ciclo	Fecha	Bioprotection	DDS*	Semana del	Operario
	Aplicación	AZV-C		Año	
1	2/08/2019**	Sí	44	31	1
	6/08/2019**		48	32	2
2	16/08/2019	Sí	58	33	1
3	11/09/2019	No	84	37	3
4	03/10/2019	Sí	106	40	3
5	18/10/2019	No	121	42	2
6	01/11/2019	Sí	135	44	4
7	05/12/2019	No	169	49	Maquinaria
8	19/12/2019	No	183	51	Maquinaria
9	02/01/2020	No	197	1	Maquinaria
10	16/01/2020	No	211	3	Maquinaria
11	28/01/2020	No	223	5	Maquinaria
12	11/02/2020	No	237	7	Maquinaria
13	27/02/2020	No	253	9	Maquinaria

\*DDS: Días Después de Siembra.

\*\*La aplicación del ciclo 1 se realizó en dos tractos por problemas con el equipo.

### 3.8 Metodología de muestreo en plantas.

Los tres muestreos realizados se llevaron a cabo a los 125 dds, 218 dds y 260 dds. En el primer y segundo muestreo se extrajeron tres plantas por unidad muestral bajo un muestreo zigzag en la cama dos y tres para el primer muestreo y cuatro y cinco para el segundo muestreo. Este consistió en extraer la planta número uno, nueve y dieciocho de la parcela útil (Figura 18).

Sin embargo, para el tercer muestreo debido a una afectación masiva (alrededor de 60% de las plantas) por floración naturalmente diferenciada (cono visible) y *Phytophthora* sp., el sistema de muestreo cambió a completamente al azar discriminando aquellas plantas que presentaban las condiciones mencionadas. Se

mantuvo la extracción de tres plantas por repetición, empero, las unidades muestrales 15, 18 y 19 (Figura 25) se descartaron ya que el 100% de las plantas presentaban al menos una de las condiciones adversas (Anexo 4).

Cabe mencionar que las tres plantas que se cosecharon por unidad muestral, se les extrajo su hoja D para la cuantificación respectiva de variables descritas a continuación.

### 3.8.1 Peso fresco de la planta

Sin su sección radicular cada planta fue pesada en fresco (kg) con un balancín colgable digital marca T-Scale Electronics MFG, modelo DR-60, con una incertidumbre de  $\pm 10$  g.



**Figura 21.** Pesaje de las plantas (kg) sin su sección radicular en el balancín colgable digital, Agroindustrial Tres Amigos S.A., Pital, 2020.

### 3.8.1 Número de hojas

Se contabilizó el número de hojas de cada planta exceptuando las hojas bajas recortadas que provienen del hijo sembrado. De esta manera se logra determinar con mayor exactitud las hojas realmente emitidas por la planta al momento del muestreo.

### 3.8.2 Longitud de la hoja D

Cada hoja D fue medida (cm) completamente extendida desde su base hasta la punta con la ayuda de una cinta métrica marca Stanley.

### 3.8.3 Ancho de la hoja D

La metodología empleada fue unir los extremos (punta y base) de la hoja D y realizar la medición (cm) justo en el ancho del dobléz con una cinta métrica marca Stanley.

### 3.8.4 Peso de la hoja D

Las hojas D de cada repetición fueron pesadas (g) haciendo uso de una balanza digital marca Ohaus, modelo EC Series, con una incertidumbre de  $\pm 0,2$  g.

### 3.8.5 Área foliar de la hoja D

Para realizar la estimación del área foliar en la hoja D se utilizó la fórmula propuesta por Rebolledo-Martínez (1992).

$$\text{Área foliar (cm}^2\text{)} = 34,6087 + 5,65202 * \text{Peso fresco hojas (g)}$$

### 3.8.6 Peso seco de la planta

Se obtuvo mediante el secado de tres submuestras de hojas D y tres submuestras de tallos por unidad muestral. Se cuantificó el peso fresco ( $P_f$ ) de ambos órganos y se introdujeron en el horno de secado. Este

procedimiento se realizó en un horno por convección a una temperatura constante de 55°C durante cinco días o más según la evaluación previa.

Antes de cuantificar el peso seco ( $P_s$ ) las muestras se dejaron reposar 10 min para estabilizar su temperatura. En ambos pesajes se utilizó una balanza digital marca Ohaus, modelo EC Series, con una incertidumbre de  $\pm 0,2g$ .

Finalmente se aplicó la siguiente fórmula:

$$P_{seco\ planta}(g) = \frac{P_s\ subhoja\ (g) + P_s\ subtallo\ (g)}{P_f\ subhoja\ (g) + P_f\ subtallo\ (g)} * P_{fresco\ planta}\ (g)$$



**Figura 22.** Proceso de secado de la submuestra hoja y submuestra tallo para cada repetición, Laboratorio de Análisis Agronómicos, TEC San Carlos, 2020. Nota: A) Hoja D en fresco. B) Hoja D seca a 55°C durante 5 días. C) Tallos en fresco. D) Tallos secos a 55°C durante 5 días.

### 3.8.7 Análisis foliar

Únicamente se analizó el contenido (%) de nitrógeno presente en la hoja D al momento del muestreo I y III. Para ello se utilizó la triada de hojas D extraídas en cada unidad muestral, lo que significa que cada tratamiento contó con cuatro análisis foliares independientes.

Antes de iniciar el proceso de secado descrito anteriormente, a cada hoja D se le removi6 su tercio superior y posteriormente se realiz6 un lavado con agua natural para la remoci6n de residuos, especialmente part6culas de suelo que pudieran alterar el contenido qu6mico real de la muestra.

Finalizado el pesaje de materia seca, se procedi6 al molido e identificaci6n de las muestras para el an6lisis foliar *per se* utilizando el m6todo Dumas



**Figura 23.** Preparaci6n de las muestras para el an6lisis foliar mediante el m6todo de Dumas. Foto: A) Remoci6n del tercio apical de las hojas D. B) Molido de las hojas y su respectiva identificaci6n de laboratorio.

### 3.8.8 Análisis químico de suelo

Se realizaron dos muestreos de suelo para análisis químico, con el propósito de determinar el estado de fertilidad química al inicio y al final del ensayo. El lugar presenta una pendiente por lo que el terreno se seccionó en “Parte Alta” y “Parte Baja”, haciendo referencia esta última a la zona inclinada.

El primer muestreo se efectuó a 20 cm de profundidad el 1 de agosto del 2019 con un barreno metálico. En cada sección se extrajeron cinco muestras mediante un recorrido zigzag. El segundo muestreo se realizó el 6 de marzo del 2020 replicando la metodología empleada en el anterior.

Al finalizar los respectivos muestreos, se realizó el “cuarteo” de la muestra para homogenizar la misma y alcanzar un peso aproximado de 500 g. El análisis se llevó a cabo en el Laboratorio de Análisis Agronómicos del Tecnológico de Costa Rica, Campus Tecnológico Local San Carlos, a través de las soluciones extractoras KCl y Olsen Modificado, luego leído en Absorción Atómica.



**Figura 24.** Metodología de cuarteo para la muestra, Agroindustrial Tres Amigos, S.A., Pital, 2020.

### **3.8.9 Análisis microbiológico de suelo**

Con el objetivo de determinar la presencia de *Azotobacter chroococcum* en el área experimental, se realizaron dos muestreos microbiológicos una vez finalizadas las aplicaciones de la misma.

El primer muestreo se efectuó el 12 de noviembre del 2019 (146 DDS), utilizando un barreno metálico y guantes para evitar contaminar las muestras. Se realizaron tres extracciones en cada unidad muestral al pie de la planta, a una profundidad de 20 cm.

Además de obtener muestras de cada tratamiento, se tomó la muestra de un T<sub>control</sub> conformado por suelo de bloques vecinos al área experimental, para así determinar la población natural de la bacteria en cuestión.

El segundo muestreo se realizó el 4 de febrero del 2020 (230 DDS), replicando lo descrito anteriormente. Las extracciones de cada repetición se unificaron y cuartearon para representar a sus respectivos tratamientos con una única muestra de aproximadamente 300 g.

Estas fueron llevadas bajo refrigeración a las instalaciones de Laboratorios Dr. Obregón en la provincia de Heredia. Allí se elaboraron diluciones seriales  $10^3$ ,  $10^4$  y  $10^6$  y se colocaron en cajas Petri con medio de cultivo “Azotobacter agar (manitol)” el cual es específico para *Azotobacter* sp.

### **3.9 Diseño experimental**

Debido a la gradiente en el terreno mencionada anteriormente, se utilizó un diseño de Bloques Completos al Azar compuesto por cuatro bloques con cinco tratamientos en cada uno.

### 3.9.1 Modelo estadístico

El modelo matemático planteado para la presente investigación fue el siguiente:

$$Y_{ij} = \mu + \beta_i + T_j + \epsilon_{ij}$$

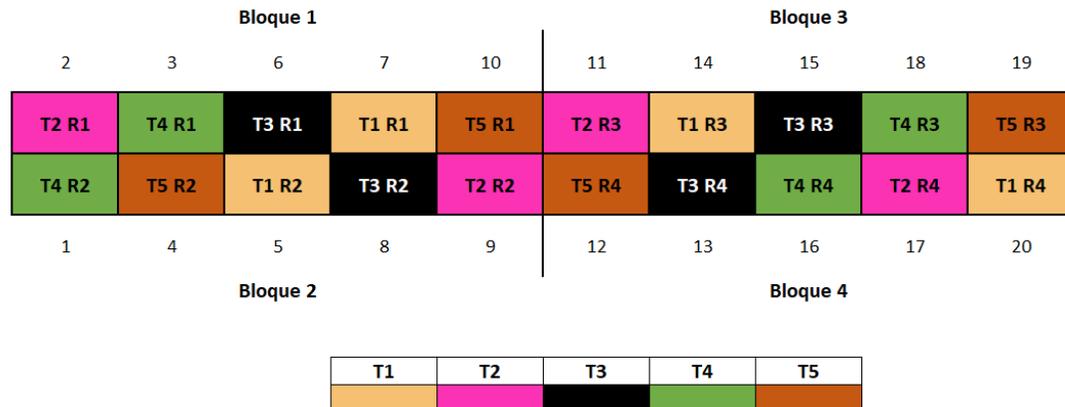
$\mu$  = media general,

$\beta_i$  = efecto del i-ésimo bloque

$T_j$  = efecto del j-ésimo tratamiento

### 3.9.2 Croquis sobre la distribución de los tratamientos

La representación esquemática con la distribución de los cinco tratamientos en los cuatro bloques experimentales se presenta en la Figura 25. Como se señaló anteriormente el bloque 35 de la finca se subdividió longitudinalmente y transversalmente a la mitad.



**Figura 25.** Representación esquemática de los cinco tratamientos en cada bloque experimental, Agroindustrial Tres Amigos S.A., Pital, 2020.

### 3.9.3 Plan de análisis estadístico

El análisis estadístico se realizó con el paquete InfoStat (Di Rienzo *et al.* 2019). Todas las variables se sometieron a un ajuste de heteroscedasticidad mediante la técnica Modelos Lineales Generales y Mixtos. Una vez encontrado el mejor modelo posible, se efectuó la prueba de comparación de medias DGC (Di Rienzo, Guzmán y Casanova) para identificar las diferencias estadísticas entre tratamientos con un nivel de significancia de 0,05.

## 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 4.1 Condición química del área experimental

En el Cuadro 11 y Cuadro 12 se presentan los resultados del análisis de suelo químico y su relación de bases respectivamente. Para cada etapa, las diferencias entre secciones del área experimental fueron mínimas en la mayoría de los elementos. No obstante, en ningún caso las bases de la fertilización se encontraron dentro del rango óptimo planteado por Molina y Meléndez (2002).

**Cuadro 11.** Resultado del análisis químico del estado de fertilidad del suelo en el área experimental al inicio y al final de la investigación, Agroindustrial Tres Amigos S.A., Pital, 2020.

Etapa	Identificación	pH	Ácidez Ext.	cmol(+)/L			mg/L				
				Ca	Mg	K	Cu	Mn	Fe	Zn	P
I Muestreo	Parte Alta	4,89	0,99	2,63	0,56	0,18	10	14	47	3,43	4,88
	Parte Baja	4,79	1,85	1,73	0,54	0,18	10	12	191	3,36	13,69
II Muestreo	Parte Alta	4,60	2,22	2,31	0,49	0,10	13	25	73	1,93	2,50
	Parte Baja	4,29	2,57	2,35	0,51	0,18	13	16	129	1,88	3,74

**Cuadro 12.** Relación de bases catiónicas en el suelo del área experimental al inicio y al final de la investigación, Agroindustrial Tres Amigos S.A., Pital, 2020.

Etapa	Identificación	Ca/Mg	Ca/K	Mg/K	(Ca+Mg)/K	C.I.C.E	Saturación Acidez (%)
I Muestreo	Parte Alta	4,7	14,6	3,1	17,7	4,36	22,71
	Parte Baja	3,2	9,6	3,0	12,6	4,30	43,02
II Muestreo	Parte Alta	4,7	23,1	4,9	28,0	5,12	43,36
	Parte Baja	4,6	13,1	2,8	15,9	5,61	45,81

Este bajo nivel de fertilidad se puede justificar mediante varias hipótesis y/o la relación entre ellas. Primeramente, a que por su origen sea un suelo con un pobre contenido químico; segundo debido a un desgaste por la intensa y prolongada explotación del mismo en la producción piñera. Finalmente, de

acuerdo con Jahn *et al.* (2009) y Bartholomew *et al.* (2018) podría deberse a que la preparación de terreno (siembra y drenajes) conlleva un enorme movimiento de suelo, provocando que el horizonte mineral con mayor contenido nutricional (A) sea profundizado y por ende se dificulte su captación para el análisis.

La variación presentada entre etapas se debe a la interacción aporte – remoción que se produce ante el crecimiento de las plantas. Asimismo, se evidencia una disminución y un incremento del pH y acidez intercambiable respectivamente. Esta última cuantifica el contenido de  $Al^{3+}$  y  $H^+$  dentro del complejo de intercambio catiónico efectivo (CICE) y su valor óptimo debería ser menor a 0,3 cmol(+)/L (Molina 2008).

La disminución en el pH y aumento de la acidez extraíble puede estar asociada a la fertilización nitrogenada con urea, ya que según Molina y Espinosa (1999) la nitrificación provoca la acidificación del suelo. El descenso en este criterio, acrecienta la  $[Al^{3+}]$  y  $[H^+]$  a causa de su solubilización en la solución del suelo y por ende el incremento en saturación de acidez presentado (Molina 2008).

Molina y Meléndez (2002) establecen que el pH óptimo en el suelo es entre 6 y 7; sin embargo Py *et al.* (1987) y Herrera (2001) mencionan que en el cultivo de piña este valor debe oscilar entre 4,5 y 5,5. Por otro lado, Bertsch (1998) indica que la planta de piña tolera hasta un 30% de saturación de acidez.

A pesar de esto, Ortiz (2013) y Rojas (2018) hallaron escenarios aún más desfavorables en pH y saturación de acidez en otras zonas de Agroindustrial Tres Amigos S.A., que las encontradas en el presente estudio. Además, este último reportó rendimientos de hasta 7785 cajas exportables/ha, lo que puede indicar que la planta de piña tiene la capacidad de desarrollarse y producir fruta aún bajo condiciones más drásticas que las mencionadas en la literatura.

#### **4.2 Conductividad eléctrica y pH de las disoluciones de los tratamientos**

El pH no manifestó mayor variación entre las mezclas, sin embargo la conductividad eléctrica (CE) mostró un comportamiento inversamente proporcional a la concentración de urea/L propia de cada programa (Cuadro 13).

**Cuadro 13.** Características químicas presentes en las soluciones de los programas de fertilización en Agroindustrial Tres Amigos S.A., Pital, 2019.

<b>Tratamiento</b>	<b>pH</b>	<b>Conductividad Eléctrica (mS/cm)</b>
T1 (finca)	3,13	32,81
T2 (20%)	3,10	36,16
T3 (30%)	3,14	37,73
T4 (40%)	3,01	40,39
T5 (50%)	3,04	40,57

Hirzel (2009) menciona que el rango de pH ideal para soluciones nutritivas es entre 5,5 – 6,5 para asegurar la completa disponibilidad de los nutrientes a la planta. Además, sugiere que la CE debe ser menor a 1,5 mS/cm para no ocasionar daños a la planta debido a la concentración de sales, aunque esto varía según el cultivo (Kafkafi y Tarchitzky 2012). Una CE mayor o igual a 8 mS/cm puede disminuir hasta en un 50% el rendimiento de cultivos como tomate, maíz, naranja, papa y melón (Hirzel C 2009).

Rojas (2018) en mezclas de fertilización post forzamiento del cultivo de piña obtuvo valores de pH cercanos a 5,7 y una CE inferior a 20 mS/cm. A pesar de esto, los datos del presente estudio en cuanto a CE, se consideran en el rango de tolerables por la planta según Obando (2019)<sup>6</sup>, quien a su vez, menciona que el cultivo de piña manifiesta afectaciones cuando la CE es superior a 80 mS/cm.

Es probable que los niveles de pH encontrados se deban a la presencia de ácido cítrico y otros productos comerciales de carácter ácido en la solución. Para el caso de la CE, se denota un incremento conforme el contenido de nitrógeno disminuye en cada tratamiento. Con lo analizado en la presente investigación, no fue posible esclarecer esta correlación negativa, ya que la urea fue el único componente que varió su concentración en los tratamientos y según Kafkafi y Tarchitzky (2012) esta fuente no presenta carga eléctrica cuando es disuelta en agua.

---

<sup>6</sup> Obando, JD. 05 de diciembre del 2019. Niveles de conductividad eléctrica típicos en la fertilización del cultivo de piña (entrevista). Aguas Zarcas, San Carlos. Trabajador independiente especializado en el cultivo de piña.

### 4.3 Población de *Azotobacter chroococcum* en el suelo

El período de análisis poblacional comprende un total de 182 días (lapso entre la primera inoculación de Bioprotection AZV-C y el segundo muestreo microbiológico). En el Cuadro 14 se presentan los resultados de los análisis de densidad bacteriana (UFC/g).

**Cuadro 14.** Estudio poblacional (UFC/g) de *Azotobacter chroococcum* en dos etapas posteriores a la aplicación de Bioprotection AZV-C en plantas de piña, Agroindustrial Tres Amigos S.A., Pital, 2020.

Tratamiento	146 DDS* (UFC/g)			230 DDS* (UFC/g)		
	10 <sup>3</sup>	10 <sup>4</sup>	10 <sup>6</sup>	10 <sup>3</sup>	10 <sup>4</sup>	10 <sup>6</sup>
T control	6x10 <sup>3</sup>	<10 <sup>4</sup>	<10 <sup>6</sup>	>10 <sup>3</sup>	8x10 <sup>4</sup>	<10 <sup>6</sup>
100% N	>10 <sup>3</sup>	2,6x10 <sup>4</sup>	<10 <sup>6</sup>	>10 <sup>3</sup>	>10 <sup>4</sup>	6x10 <sup>6</sup>
-20% N + Bio**	>10 <sup>3</sup>	>10 <sup>4</sup>	2,0x10 <sup>6</sup>	>10 <sup>3</sup>	6x10 <sup>4</sup>	<10 <sup>6</sup>
-30% N + Bio**	>10 <sup>3</sup>	>10 <sup>4</sup>	6,0x10 <sup>6</sup>	1x10 <sup>3</sup>	<10 <sup>4</sup>	<10 <sup>6</sup>
-40% N + Bio**	>10 <sup>3</sup>	>10 <sup>4</sup>	2,8x10 <sup>6</sup>	>10 <sup>3</sup>	2,2x10 <sup>4</sup>	<10 <sup>6</sup>
-50% N + Bio**	>10 <sup>3</sup>	>10 <sup>4</sup>	2,4x10 <sup>6</sup>	>10 <sup>3</sup>	2,6x10 <sup>4</sup>	<10 <sup>6</sup>

\*DDS: Días Después de Siembra.

\*\*El signo negativo referencia la reducción. Bio = Bioprotection AZV-C.

Con los resultados obtenidos, se puede confirmar la presencia por parte de *A. chroococcum* en el área experimental. La cantidad de UFC/g encontrada en las distintas disoluciones, fue equivalente al número de bacterias existentes a la profundidad del muestreo, por lo tanto, una mayor disolución de análisis, implica un importante beneficio poblacional según Obregón (2020)<sup>7</sup>.

En la fase cero se inició con una densidad poblacional de 4,4x10<sup>6</sup> UFC/g en los tratamientos correspondientes. El primer muestreo logró evidenciar que 12 días posteriores a la última inoculación, la población había disminuido levemente excepto en la reducción 30% + Bioprotection, sin embargo todos continúan con un nivel de 10<sup>6</sup> UFC/g. Con esto se logra concluir que a pesar de las condiciones desfavorables para microorganismos que otorgan los sistemas piñeros como el pH del suelo, conductividad eléctrica y pH de las mezclas; *A. chroococcum* tiene la capacidad

<sup>7</sup> Obregón Gómez, MA. 26 de mayo del 2020. Comportamiento y población de *Azotobacter* sp. en el suelo (entrevista). San Francisco, Heredia, Costa Rica. Propietario de Laboratorios Doctor Obregón.

tolerar dichos ambientes y establecerse en el suelo. En parte, esto es posible gracias al efecto buffer del suelo en el intento por regresar a su condición natural (Furcal 2020<sup>8</sup>; Obregón 2020<sup>9</sup>). Esto es reforzado por los resultados de Ehalotis *et al.* (1999), quienes mantuvieron a *Azotobacter* sp. en un medio líquido con pH de 4,9 y CE de 15 mS/cm y su población se redujo casi a cero en el quinto día post inoculación.

Mediante el segundo muestreo se denotó que la población de *A. chroococcum* disminuyó a un nivel de 10<sup>4</sup> UFC/g en los tratamientos reducción 20%, 40% y 50% + Bioprotection; y a 10<sup>3</sup> UFC/g en la reducción 30% + Bioprotection. A pesar de ello, se logró confirmar la permanencia de la bacteria inclusive 93 días posteriores a la última inoculación y en coexistencia con el 100% del nitrógeno reincorporado por la finca a los 170 DDS.

Es importante hacer énfasis en la sobrevivencia de la *A. chroococcum* respecto a los ambientes de pH del estudio y los cambios que en él ocurren. Esto porque según lo indicado por Dilworth *et al.* (1988), Wani *et al.* (2016) y Mahato y Kafle (2018) el desarrollo y función de *A. chroococcum* no sería posible bajo las condiciones de esta investigación.

Respecto al comportamiento poblacional a través del tiempo, la disminución presentada no concuerda con lo encontrado por Córdova-Bautista *et al.* (2009) quienes reportan la multiplicación poblacional de *A. chroococcum* en diversos sustratos a lo largo de 60 días en el cultivo de banano, bajo un pH de 7,5; materia orgánica de 6,83% y una humedad en el sustrato de 26%.

Por otra parte, la formación de colonias en T control, indica que en el suelo de la finca hay especies de *Azotobacter* sp. nativas. Esto es posible confirmarlo debido a la especificidad del medio de cultivo utilizado. La condición de bacteria nativa no es ajena en sistemas agrícolas intensivos, Córdova-Bautista *et al.* (2009) reportan 2x10<sup>4</sup> UFC/g de bacterias nativas de este género en los primeros 20 cm del suelo

---

<sup>8</sup> Fucal Beriguete, P. 31 de enero del 2020. Dinámica del suelo (entrevista). Pital, San Carlos, Costa Rica. Profesor e investigador del Tecnológico de Costa Rica, Campus Tecnológico Local San Carlos.

<sup>9</sup> Obregón Gómez, MA. 26 de mayo del 2020. Comportamiento y población de *Azotobacter* sp. en el suelo (entrevista). San Francisco, Heredia, Costa Rica. Propietario de Laboratorios Doctor Obregón.

en banano; Kizilkaya (2009) halló de manera natural un máximo de  $3 \times 10^4$  UFC/g en muestreos aleatorios a lo largo de distintas zonas geográficas. Asimismo, el desarrollo de colonias en tratamiento 100% nitrógeno, puede ser provocada por el movimiento flagelar de la bacteria incorporada en los demás tratamientos, que aunado a una presencia nativa de la misma, genera que su densidad ascienda a  $10^4$  UFC/g (Kumari *et al.* 2017).

#### **4.4 Contenido de Nitrógeno**

En el Cuadro 3 mayoritariamente se estableció como nivel de suficiencia un contenido foliar superior a 1,5% para considerarse como óptimo, por lo que este será el criterio a utilizar. A los 125 DDS únicamente los tratamientos 100% nitrógeno y reducción 20% + Bioprotection lograron alcanzar una óptima concentración de nitrógeno, mientras que los demás tratamientos se clasificaron como deficiencias. Marca (2017) a los 135 DDS reporta 1,5% de nitrógeno en sus tratamientos lo cual coincide con los tratamientos 100% nitrógeno y la reducción 20% + Bioprotection, sin embargo al utilizar 500 kg N/ha con 4,8 plantas/m<sup>2</sup> obtuvo hasta 1,9% de este elemento en la MS.

A los 260 DDS no se encontraron diferencias significativas entre los tratamientos, además, alcanzaron un contenido de nitrógeno superior al 1,5% a excepción de la reducción 20% + Bioprotection. Rojas (2018) reporta a los 265 DDS una concentración de 1,45% mediante el paquete comercial de Agroindustrial Tres Amigos S.A.

Durante el período del primer muestreo, se observó que a pesar de la colonización de *A. chroococcum*, esta no fue capaz de suplirle a la planta el nitrógeno faltante de 30%, 40% y 50% en las mezclas correspondientes. Contrario a esto, al momento del segundo análisis, se notó una mayor paridad en la concentración de nitrógeno de los diferentes tratamientos, inclusive superando al testigo. La diferencia en estas etapas, es que a partir de los 170 DDS se inició con la aplicación del 100% del nitrógeno por parte de la finca en todos los tratamientos con reducción del mismo. Lo que parece indicar que los resultados a los 260 DDS, fueron producto del incremento en la dosis nitrogenada y no tanto por una acción

propia de *A. chroococcum*, que además presentó una disminución en la población a dicho momento. Asimismo, según Kumari *et al.* (2017) la abundancia de nitrógeno disponible inhibe la FBN, ya que la bacteria incorpora el nitrógeno del medio a su formación de glutamato, como una forma de reducir el importante gasto energético que implica “fabricar” el NH<sub>4</sub><sup>+</sup> por sí misma a través de la FBN (Lucini *et al.* 2014).

**Cuadro 15.** Concentración de nitrógeno en materia seca y su extrapolación a la densidad de siembra por hectárea en plantas de piña bajo distintas dosis de nitrógeno y la adición de Bioprotection AZV-C, Agroindustrial Tres Amigos S.A., Pital, 2020.

Tratamiento	125 DDS*			260 DDS*		
	N Total (%)	kg N/ha MS	kg N/ha aplicados	N Total (%)	kg N/ha MS	kg N/ha aplicados
100% N	1,56 ± 0,00 A	201,55	207,00	1,50 ± 0,02 A	448,80	533,6
-20% N + Bio***	1,56 ± 0,07 A	180,34	165,60	1,49 ± 0,05 A	425,54	492,2**
-30% N + Bio***	1,34 ± 0,02 B	164,02	144,90	1,54 ± 0,02 A	450,30	471,5**
-40% N + Bio***	1,35 ± 0,01 B	165,24	124,20	1,51 ± 0,04 A	338,84	450,8**
-50% N + Bio***	1,25 ± 0,05 B	144,50	103,50	1,57 ± 0,02 A	427,04	430,1**

Medias con una letra en común no son significativamente diferentes (p<0,05).

\*DDS: Días después de siembra.

\*\*Las reducciones porcentuales se realizaron únicamente para los primeros seis ciclos de fertilización, es por esto que no son proporcionales al acumulado final del testigo (kg/ha).

\*\*\*El signo negativo referencia la reducción de nitrógeno. Bio = Bioprotection AZV-C.

Del Cuadro 15 fue necesario relacionar la cantidad de kg N/ha en MS con la dosis acumulada de kg N/ha aplicados hasta el momento del análisis para evaluar el desempeño de *A. chroococcum*. La primera subvariable fue obtenida mediante la fórmula:

$$kg\ N/ha\ MS = Peso\ seco\ planta_{(kg)} * \left( \frac{\% \text{ nitrógeno foliar}}{100} \right) * \#plantas/ha$$

Según lo planteado en el Cuadro 15 para 125 DDS, en los tratamientos donde hubo una reducción de nitrógeno, el contenido del elemento en la MS/ha fue mayor que la cantidad aplicada/ha a las plantas, situación que no se presentó en el tratamiento con 100% de nitrógeno. Esto puede indicar que la diferencia entre kg N/ha MS y kg N/ha aplicados, es a causa de la FBN por parte de *A. chroococcum*, ya que según Coyne (2000), procesos que proporcionan nitrógeno como la mineralización de la materia orgánica, siempre están presentes.

Con esto se pretende demostrar que a pesar de encontrar una menor concentración de nitrógeno durante el primer muestreo en las reducciones 30%, 40% y 50%, el funcionamiento de *A. chroococcum* es real. Respecto al tratamiento con 100% nitrógeno, los kg N/ha MS fueron menores a los kg N/ha aplicados a pesar de que registró población de la bacteria, esto se puede deber a que su nivel poblacional a los 125 DDS es 20 veces menor al encontrado en los demás tratamientos con inoculación “directa”.

Por otro lado, a los 260 DDS no se replicó el escenario general anterior, lo cual puede explicarse por la reducción poblacional de *A. chroococcum* y una menor FBN a causa del factor ya mencionado.

#### **4.5 Peso fresco de la planta**

Con base en el peso fresco de la planta y la altura se define crecimiento de la planta y con el primero el momento de la inducción floral, también, se utiliza en estimaciones de cosecha por su correlación con el calibre de la fruta (Bartholomew *et al.* 2018). Su incremento depende de la fertilización, densidad de siembra y condiciones climáticas. Además, las diferencias de peso fresco que se presentan en los bloques, están muy influenciadas por la disparidad en el peso del hijo utilizado (Muñoz 2020)<sup>10</sup>.

El comportamiento del peso fresco en las plantas de los distintos tratamientos se presenta en Figura 26. En la misma, a los 125 DDS únicamente el tratamiento T<sub>5</sub> presentó diferencias significativas debido a un menor peso respecto a las plantas de los demás tratamientos. A pesar de que previo a los 120 DDS las plantas no presentan una exigente demanda de nitrógeno, el escenario con reducción del 50% indicó que a su nivel de fertilización nitrogenada, hubo una afectación en crecimiento por el faltante de este elemento, aún con la adición de Bioprotection AZV-C (Gambin y Herrera 2012; Bartholomew *et al.* 2018).

En el lapso hacia el segundo muestreo las plantas presentaron una ganancia de peso/semana de 72 g (100% N), 74 g (-20% N), 65 g (-30% N), 40 g (-40% N) y 47

---

<sup>10</sup> Muñoz, J. 25 de febrero del 2020. Muestreos peso planta para inducción floral (entrevista). Piedra Alegre de Pital, Costa Rica. Agroindustrial Tres Amigos S.A.

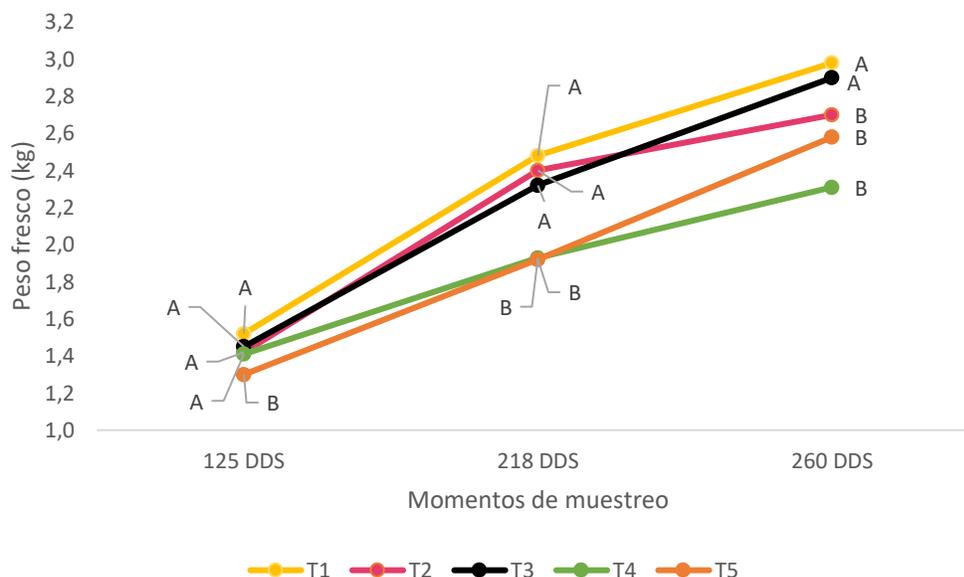
g (50% N). Las ganancias de peso en los tratamientos 100% nitrógeno y reducción 20% + Bioprotection superaron la ganancia de peso de Agroindustrial Tres Amigos S.A., donde bajo sus condiciones proyecta una ganancia de peso/semana promedio de 68 g (0,15 lb).

A los 218 DDS los tratamientos 100% N, -20% N + Bioprotection y -30% N + Bioprotection, no presentaron diferencias significativas entre sí, mientras que sí difieren de los tratamientos con mayor reducción nitrogenada. Los resultados obtenidos fueron inferiores a los reportados por Fonseca (2010) y Rodríguez (2010) quienes a los 210 DDS y 225 DDS respectivamente, obtuvieron pesos de 3 kg/planta.

El último muestreo tuvo lugar dos días después del forzamiento. En esta instancia, los tratamientos 100% N y -30% N + Bioprotection presentaron el mayor peso fresco, diferenciándose estadísticamente de los demás. Los tratamientos 100% N, -20% N + Bioprotection y -30% N + Bioprotection estuvieron acorde con los reportados por Gamboa (2006) quien reporta un peso correspondiente a 2,7 kg/planta a los 255 DDS. Asimismo, fueron superiores a los reportados por Rojas (2018) en una investigación dentro de la misma finca, donde utilizó plantas forzadas a los 263 DDS con un peso de 2,5 kg/planta.

En este tercer muestreo, las plantas presentaron una ganancia de peso/semana de 83 g (100% N), 50 g (-20% N), 97 g (-30% N), 63 g (-40% N) y 110 g (-50% N). El comportamiento atípico en las reducciones de 20% N + Bioprotection y 50% N + Bioprotection respecto a la ganancia de peso de la etapa anterior, obedeció a un efecto de muestreo por a la afectación por *Phytophthora* sp. y floración natural (Anexo 4).

Ahora bien, a excepción del tratamiento dos, se mostró un aumento propiamente en la tasa de crecimiento; esto se debió a que a partir de 200 DDS la absorción de nitrógeno incrementa exponencialmente (Gambin y Herrera 2012). Finalmente, Gamboa (2006) reporta resultados similares y además determina que el mayor crecimiento de la planta se da entre los 180 DDS y 225 DDS; posterior a ello la ganancia de peso/semana se reduce a la mitad.



**Figura 26.** Comportamiento del peso fresco (kg) a través del tiempo en plantas de piña bajo distintas dosis de nitrógeno y la adición de Bioprotection AZV-C, Agroindustrial Tres Amigos S.A., Pital 2020.

Por otro lado, Agroindustrial Tres Amigos S.A., como parte de sus prácticas de campo, realizó un muestreo de peso a 230 DDS en el bloque que albergó el área experimental (Cuadro 16). Se obtuvo un promedio ponderado de 2,15 kg (4,75 lb), según Muñoz (2020)<sup>11</sup> la finca permite incorporar al grupo de fuerza bloques que registren este peso, para evitar su rezago. Sin embargo, enfatiza en un rango ideal de 2,25 kg – 2,5 kg (5,0 lb – 5,5 lb). Además, menciona que deben imperar las plantas grandes y medianas por la demanda comercial de sus posibles calibres de fruta, aunque establece que en ocasiones la relación tamaño planta – calibre fruta no se cumple.

<sup>11</sup> Muñoz, J. 25 de febrero del 2020. Muestreos peso planta para inducción floral (entrevista). Piedra Alegre de Pital, Costa Rica. Agroindustrial Tres Amigos S.A.

**Cuadro 16.** Muestreo de peso fresco 230 DDS realizado por el departamento de servicios técnicos de Agroindustrial Tres Amigos S.A., Pital, 2020.

Tamaño Planta	Rango de Peso (kg)	Peso planta (kg)	Calibre de fruta	Número de Plantas	Equivalencia (%)
Extra Grande	>2900	3050	>5	2	3,03
Grande	2401 - 2900	2650	6 – 7	22	33,33
Mediana	1901 - 2400	2075	8 – 9	27	40,91
Pequeña	1400 - 1900	1575	10 – 11	14	21,21
Muy Pequeña	<1400	1075	<12	1	1,52

Mediante la Figura 26 es posible observar que los tratamientos 100% N y las reducciones 20% N + Bioprotection y 30% N + Bioprotection a los 218 DDS ya habían alcanzado el rango de peso indicado para la inducción floral, por tanto, dos de los programas propuestos, a pesar de utilizar menos nitrógeno, cumplieron en tiempo a lo esperado por la finca. Esto también lo refleja el Cuadro 16 ya que en el área experimental a los 230 DDS imperaron las plantas grandes y medianas que posiblemente en su mayoría, pertenecían a los tratamientos en cuestión.

Por el comportamiento mostrado a lo largo del ciclo (Figura 26), se evidenció que las reducciones en un 40% y 50% ofrecieron una dosificación tal, que no sustentaron la demanda nitrogenada para la formación de proteínas, provocando una disminución significativa en el peso fresco/planta en comparación con los demás tratamientos y que, la adición de Bioprotection AZV-C tampoco satisfizo dicha necesidad. Por otra parte, las reducciones 20% N + Bioprotection y 30% N + Bioprotection, reflejan un desempeño similar a lo demostrado por el tratamiento con 100% N, quien siempre presentó las plantas con mayor peso fresco. Esto indica que *A. chroococcum* fue capaz de reponer una cantidad de nitrógeno similar a la restringida respectivamente en dichos tratamientos hasta posiblemente los 170 DDS, momento en el cual se incorporó el 100% del nitrógeno, por lo que la paridad en peso fresco/planta a los 218 DDS y 260 DDS, está influenciada mayormente por la reincorporación completa del fertilizante nitrogenado y en menor medida por las

funciones de la bacteria como la FBN, producción de hormonas, vitaminas y aminoácidos, de acuerdo con Chennappa *et al.* (2019).

El repunte de T<sub>5</sub> hacia el último tercio de la evaluación fue inesperado y no es posible asegurar que su comportamiento se replique en otras investigaciones. Esta tendencia se presentó en las demás variables evaluadas y se desconoce si se debió a un efecto causado por la dosis utilizada y su posterior duplicación a partir del ciclo siete de fertilización.

#### **4.6 Peso seco de la planta**

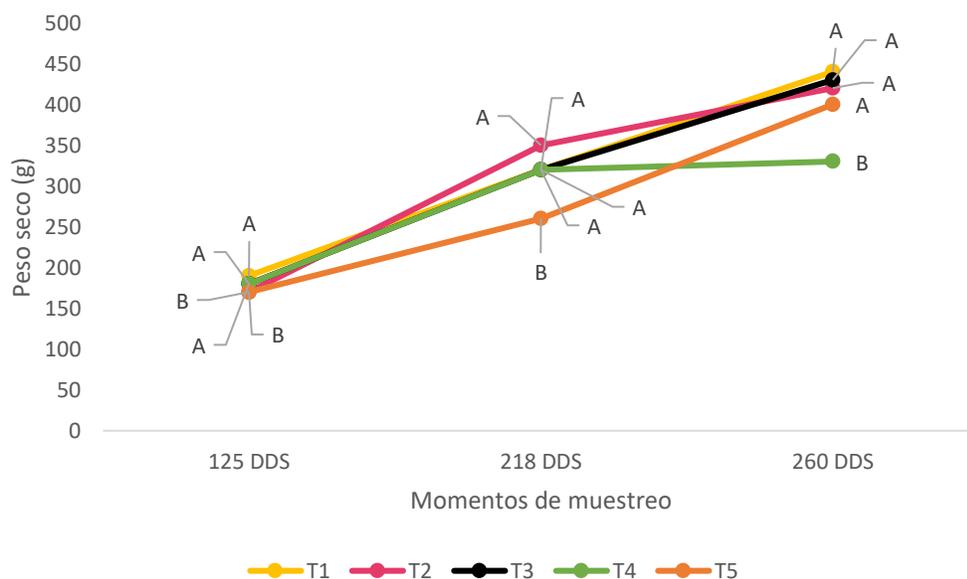
La acumulación de materia seca (MS) en la planta, es uno de los factores que influyen en el rendimiento de la actividad piñera. El contenido en la MS está condicionado por factores ambientales como la temperatura, además del peso inicial del hijo y la tasa de crecimiento del cultivo (Snyder y Carlson 1984; Zhang y Bartholomew 1997).

El contenido de MS en las plantas del estudio es presentado en la Figura 27. A lo largo de la fase vegetativa, se mantuvo una activa acumulación de MS, lo que se evidenció con el peso seco (PS) de la planta. A los 125 DDS los tratamientos 100% N y las reducciones de 30% N + Bioprotection y 40% N + Bioprotection, presentaron diferencias significativas respecto a las reducciones de 20% N + Bioprotection y 50% N + Bioprotection debido a un mayor PS/g en sus plantas. Bartholomew *et al.* (2018) menciona que con una temperatura máxima de 30°C y mínima de 22°C, se puede alcanzar un peso seco entre 150 g/planta y 200 g/planta a los 125 DDS, lo cual coincide con la temperatura presentada y los resultados obtenidos en todos los tratamientos.

A los 218 DDS únicamente el tratamiento con reducción de 50% N + Bioprotection presentó diferencias significativas a causa de un PS inferior a los demás tratamientos. Rebolledo-Martínez *et al.* (2005) utilizaron hijo guía de 500 g y una dosis total de 675 kg N/ha, empero, a los 210 DDS el PS sobrepasó los 200 g/planta, siendo inferior a lo encontrado en el presente trabajo a pesar de utilizar una mayor cantidad de fertilizante. Por su parte Rodríguez (2010) reporta a los 225 DDS un PS máximo de 357 g/planta. Finalmente, bajo las condiciones señaladas

por Bartholomew *et al.* (2018) las plantas cercanas a 200 DDS deben presentar entre 350 g/planta y 400 g/planta de PS, sin embargo, ningún tratamiento logró superar dicho rango. Esto pudo ser a causa de la chapia realizada entre el primer y segundo muestreo, ya que según Bartholomew *et al.* (2018), esta práctica representa un retraso en el crecimiento y una disminución en el rendimiento debido a la pérdida de MS ya acumulada en la porción removida (Anexo 5).

Durante el último muestreo a los 260 DDS, la mezcla con reducción del 40% + Bioprotection presentó diferencias significativas debido a un menor PS. A pesar de ello, los resultados obtenidos son superiores a los reportados por Py *et al.* (1987); Zhang y Bartholomew (1997); Rebolledo-Martínez *et al.* (2005); González *et al.* (2013) e inferiores bajo las condiciones reportadas por Bartholomew *et al.* (2018).



**Figura 27.** Comportamiento del peso seco (g) a través del tiempo en plantas de piña bajo distintas dosis de nitrógeno y la adición de Bioprotection AZV-C, Agroindustrial Tres Amigos S.A., Pital 2020.

Mediante los resultados de PS (Figura 27) fue posible afirmar que reducciones nitrogenadas del 20% (T<sub>2</sub>) y 30% (T<sub>3</sub>) asociados a la incorporación de Bioprotection, posibilitan a la planta mantener una acumulación de MS similar al tratamiento con 100% N alrededor de los 170 DDS, ya que como se mencionó anteriormente la similitud de estos tres tratamientos a los 218 DDS y 260 DDS sea, en su mayoría, producto de la incorporación del 100% del nitrógeno en los tratamientos reducidos.

La reducción 40% N a pesar de mostrar un comportamiento similar durante los dos primeros muestreos, no refleja esta constancia en la mayoría de las demás variables, por lo que en conjunto con la mezcla reducida en 50% N, provocaron una menor tasa de crecimiento, que no fue posible sopesar aún con la adición de Bioprotection AZV-C y la incorporación de la dosificación completa de nitrógeno, situación que se refleja a los 218 DDS y 260 DDS en la Figura 27.

El efecto de *A. chroococcum* respecto a PS ha sido evaluado en diversos cultivos. Shirinbayan *et al.* (2019) reportan un incremento del 30% en el peso seco de brotes en maíz al utilizar *A. chroococcum* versus no utilizarlo. Sánchez-López *et al.* (2019) reportan un mayor peso seco significativo en papa al utilizar 75% de nitrógeno + *A. chroococcum* versus 100% de nitrógeno en la fertilización. Finalmente, Lozada y Rivas encontraron diferencias menores a 1% de MS en chile dulce respecto a utilizar 100% nitrógeno químico y realizar una reducción del 30% del elemento e incorporar *A. chroococcum*.

## **4.7 Peso, longitud y ancho de hoja D**

### **4.7.1 Peso fresco de la hoja D**

Los resultados alcanzados durante las etapas en cada uno de los tratamientos se muestran en el Cuadro 17. En la evaluación a los 125 DDS, el tratamiento 100% N presentó la mayor media de peso fresco de la hoja D, sin embargo, no distó significativamente de la reducción 20% N + Bioprotection, mas sí lo hace de los tratamientos restantes. Los resultados obtenidos en esta etapa fueron altamente superiores a los encontrados por Fournier *et al.* (2010) y Marca (2017) quienes detallan un peso máximo de 38 g y 40 g respectivamente, en 135 DDS.

A los 218 DDS, nuevamente el 100% N presentó la mayor media de peso fresco de la hoja D, aunque en esta ocasión se diferenció estadísticamente de las reducciones en 40% N + Bioprotection y 50% N + Bioprotection. Rodríguez (2010) a 225 DDS detalla un peso máximo de 129 g, siendo hondamente superior a los encontrados en la presente investigación.

En la última etapa de evaluación fue la reducción en un 30% N + Bioprotection quien presentó diferencias significativas con la mezcla reducida en un 40% N + Bioprotection. Fournier *et al.* (2010) obtuvo un peso de aproximadamente 85 g a los 250 DDS, lo cual es inferior a lo reportado en todos los tratamientos de este ensayo.

**Cuadro 17.** Comportamiento del peso fresco hoja D a través del tiempo en plantas de piña bajo distintas dosis de nitrógeno y la adición de Bioprotection AZV-C, Agroindustrial Tres Amigos S.A., Pital, 2020.

Tratamiento	Peso Hoja D (g)		
	125 DDS*	218 DDS*	260 DDS*
100% N	68,82 ± 2,02 A	90,43 ± 3,12 A	99,28 ± 4,37 A
-20% N + Bio**	64,53 ± 2,36 A	85,23 ± 5,26 A	100,65 ± 3,42 A
-30% N + Bio**	60,50 ± 3,13 B	89,41 ± 5,94 A	104,75 ± 5,47 A
-40% N + Bio**	57,37 ± 2,04 B	66,87 ± 4,63 B	88,35 ± 3,44 B
-50% N + Bio**	58,06 ± 1,89 B	68,46 ± 4,80 B	97,59 ± 1,94 A

Medias con una letra en común no son significativamente diferentes ( $p < 0,05$ ).

\*DDS: Días después de siembra

\*\*El signo negativo referencia la reducción de nitrógeno. Bio = Bioprotection AZV-C

Con los resultados obtenidos es posible afirmar que las reducciones de 40% N y 50% N aminoran el desarrollo de la hoja D a pesar de la incorporación de Bioprotection AZV-C. Sin embargo, una disminución de 20% ( $T_2$ ) aunado a la presencia de la bacteria, propicia que la hoja D presente un crecimiento estadísticamente igual a  $T_1$  a lo largo del ciclo vegetativo. A pesar de la incorporación del 100% de nitrógeno a partir de los 170 DDS, la reducción en 30% + Bioprotection también mostró la capacidad de igualar el rendimiento ofrecido por  $T_1$  respecto al peso de la hoja D.

#### 4.7.2 Longitud de la hoja D

Los resultados conseguidos durante las etapas de muestreo en cada uno de los tratamientos se presentan en el Cuadro 18. Transcurridos 125 DDS, el 100% N presentó la mayor longitud de hoja, sin presentar diferencias significativas entre tratamientos. Marca (2017) reporta una longitud de hoja D máxima de 62,3 cm, a los 135 DDS, lo cual es ampliamente inferior a los datos alcanzados en esta etapa.

Con 218 DDS en curso, nuevamente la longitud de hoja D del tratamiento 100% N presentó la mayor media, en esta ocasión hubo diferencia estadística respecto a las reducciones en 40% + Bioprotection y 50% + Bioprotection, situación no reflejada en el primer muestreo. Fonseca (2010) a los 210 DDS detalla una longitud de hoja D máxima de 125,5 cm; mientras que Rodríguez (2010) detalló una longitud de hoja D máxima de 111 cm, pasados 225 DDS. En ambos casos, dicha longitud es considerablemente superior a la encontrada en los tratamientos de la presente investigación.

A los 260 DDS de evaluación, nuevamente 100% N presentó una mayor media de longitud de hoja D, mostrando diferencias significativas con los tratamientos reducidos en 40% + Bioprotection y 50% + Bioprotection, donde a lo largo del ciclo vegetativo mostraron los menores datos de longitud en la hoja D.

**Cuadro 18.** Comportamiento de la longitud de la hoja D a través del tiempo en plantas de piña bajo distintas dosis de nitrógeno y la adición de Bioprotection AZV-C, Agroindustrial Tres Amigos S.A., Pital, 2020.

Tratamiento	Largo hoja D (cm)		
	125 DDS*	218 DDS*	260 DDS*
100% N	90,77 ± 1,74 A	99,14 ± 1,69 A	111,61 ± 1,81 A
-20% N + Bio**	87,58 ± 1,50 A	92,70 ± 1,99 A	109,91 ± 1,81 A
-30% N + Bio**	84,58 ± 2,42 A	97,40 ± 2,88 A	111,45 ± 2,08 A
-40% N + Bio**	83,59 ± 1,35 A	85,01 ± 2,57 B	107,06 ± 1,91 B
-50% N + Bio**	84,85 ± 1,24 A	87,51 ± 2,85 B	106,24 ± 0,81 B

Medias con una letra en común no son significativamente diferentes ( $p < 0,05$ ).

\*DDS: Días después de siembra

\*\*El signo negativo referencia la reducción de nitrógeno. Bio = Bioprotection AZV-C

En esta variable los tratamientos presentaron un comportamiento similar a lo reflejado en las demás variables, donde reducciones del 20% y 30% ( $T_2$  y  $T_3$  respectivamente), mantuvieron igualdad estadística con el 100% N y no así en los demás tratamientos, donde al parecer aún con la presencia de la bacteria y la integración del 100% de nitrógeno a los 170 DDS en los tratamientos, el efecto de reducción nitrogenada inicial prevaleció hasta el final de la investigación.

### 4.7.3 Ancho de la hoja D

Los resultados del ancho de la hoja D en el Cuadro 19 muestran que esta variable presenta leves variaciones a través del tiempo. Únicamente hubo diferencias significativas a los 218 DDS en los tratamientos 100% N, -20% N + Bioprotection y -30% N + Bioprotection respecto a los tratamientos restantes debido medias inferiores en el ancho de la hoja D de estos últimos. Fonseca (2010) y Rodríguez (2010) reportan un ancho de hoja D superior a 6,5 cm a los 210 DDS y 225 DDS respectivamente; mientras que los resultados del presente estudio no sobrepasaron los 6 cm de ancho.

Debido a la naturaleza de esta variable, no se esperaron incrementos abruptos a través del tiempo independientemente del tratamiento utilizado. A pesar de ello, es factible optar por lo planteado en T<sub>2</sub> y T<sub>3</sub> ya que presentaron el comportamiento que más se asemejó a 100% N, siendo estadísticamente iguales a lo largo del ciclo vegetativo.

**Cuadro 19.** Comportamiento del ancho hoja D a través del tiempo en plantas de piña bajo distintas dosis de nitrógeno y la adición de Bioprotection AZV-C, Agroindustrial Tres Amigos S.A., Pital, 2020.

Tratamiento	Ancho hoja D (cm)		
	125 DDS*	218 DDS*	260 DDS*
100% N	5,63 ± 0,14 A	5,95 ± 0,10 A	5,57 ± 0,15 A
-20% N + Bio**	5,42 ± 0,19 A	5,87 ± 0,18 A	5,66 ± 0,16 A
-30% N + Bio**	5,35 ± 0,17 A	5,83 ± 0,17 A	5,75 ± 0,14 A
-40% N + Bio**	5,05 ± 0,16 A	5,29 ± 0,18 B	5,33 ± 0,09 A
-50% N + Bio**	5,18 ± 0,15 A	5,37 ± 0,20 B	5,83 ± 0,22 A

Medias con una letra en común no son significativamente diferentes (p<0,05).

\*DDS: Días después de siembra

\*\*El signo negativo referencia la reducción de nitrógeno. Bio = Bioprotection AZV-C

### 4.7.4 Correlación con el peso fresco de la planta

A pesar de que el peso, longitud y ancho de la hoja D son variables que reflejan el crecimiento de la planta de piña, su análisis individual no permite identificar si existe homogeneidad en este aspecto.

Con base en esta premisa, en el Cuadro 20 se presenta un coeficiente de correlación de estas variables con el peso fresco de la planta a los 260 DDS.

Mediante los resultados obtenidos se identificó una correlación positiva que superó el 50% en casi todos los escenarios, incluso la mayoría sobrepasó el 80%, lo que indicó fuertemente que valores superiores en una variable, reflejaron un mismo comportamiento en otras, lo que desembocaron en un incremento del peso fresco de la planta de piña. Con esta información se concluyó que sin importar el tratamiento, la hoja D correlacionó positivamente con el peso de la planta.

**Cuadro 20.** Coeficiente de correlación de Pearson para las variables peso, largo y ancho de la hoja D, respecto al peso fresco de la planta a los 260 DDS, Agroindustrial Tres Amigos S.A., Pital, 2020.

Tratamiento	Variable	Coeficiente de correlación Pearson		
		Peso hoja D	Largo hoja D	Ancho hoja D
100% N		0,94	0,51	0,83
-20% N + Bio		0,79	0,65	0,51
-30% N + Bio	Peso fresco planta	0,59	0,97	0,99
-40% N + Bio		0,99	0,97	0,39
-50% N + Bio		0,82	0,96	0,60

#### 4.8 Área foliar de la hoja D

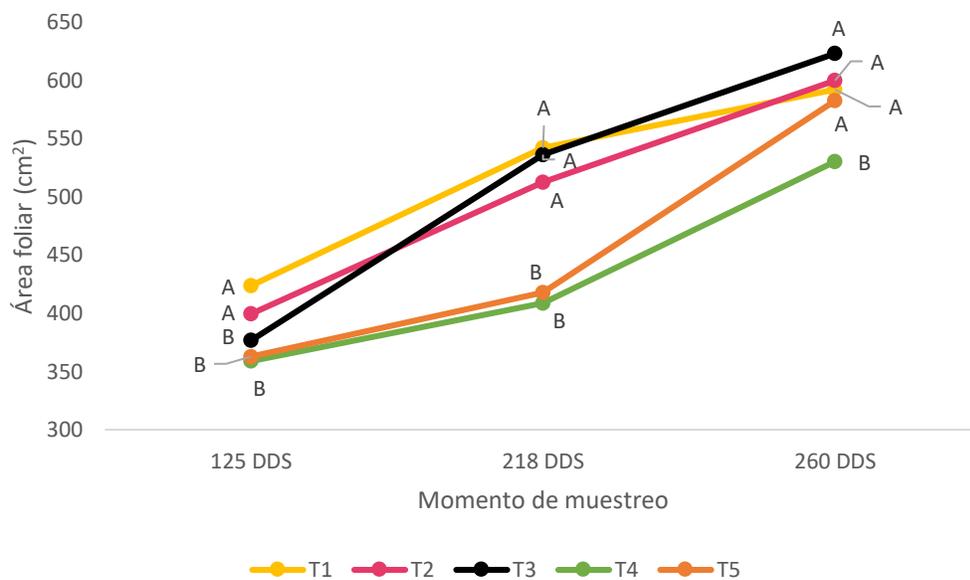
Esta variable hace referencia al espacio ocupado (cm<sup>2</sup>) por la hoja D, cuanto mayor sea posibilita a la planta ampliar el área para interceptar la radiación solar y así promover su crecimiento (Bartholomew *et al.* 2018). Según lo presentado en la Figura 28, el área foliar mostró un mayor desarrollo en los tratamientos 100% N, -20% N + Bioprotection y -30% + Bioprotection a lo largo del ciclo vegetativo.

Transcurridos 125 DDS, 100% N presentó la mayor media en área foliar, mostrando diferencias significativas con -30% N + Bioprotection, -40% N + Bioprotection y -50% N + Bioprotection. Este resultado fue similar con lo expuesto en el peso fresco de la hoja D (Cuadro 17) por lo tanto, *A. chroococcum* no logró mantener un mismo desarrollo en el área foliar especialmente en los tratamientos de menor aporte nitrogenado.

A los 218 DDS los tratamientos 100% N, -20% N + Bioprotection y -30% + Bioprotection fueron estadísticamente iguales por lo que, además de la adición

del 100 % nitrógeno a todos los tratamientos reducidos a los 170 DDS, la presencia de *A. chroococcum* permitió aminorar las posibles diferencias a pesar de la condición específica de dichos tratamientos. González *et al.* (2013) reporta un área foliar en la hoja D de 300 cm<sup>2</sup> a los 210 DDS, lo cual fue superado por inclusive los tratamientos -40% N + Bioprotection y -50% N + Bioprotection del presente estudio en cualquier fecha de las evaluaciones.

En el muestreo final, únicamente hubo diferencias significativas respecto al tratamiento con reducción del 40% N + Bioprotection por su menor desarrollo del área foliar. Por su parte, Pereira dos Santos *et al.* (2018) a los 270 DDS reportan áreas foliares menores a 500 cm<sup>2</sup>, siendo considerablemente inferiores a lo encontrado en todos los tratamientos de esta investigación.



**Figura 28.** Comportamiento en el área foliar (cm<sup>2</sup>) a través del tiempo en plantas de piña bajo distintas dosis de nitrógeno y la adición de Bioprotection AZV-C, Agroindustrial Tres Amigos S.A., Pital 2020.

#### 4.9 Número de hojas

La planta presentó una activa emergencia de hojas hasta los 218 DDS, posterior a ello no hubo un manifiesto importante de producción de hojas (Figura 29). Sin embargo, esto no quiere decir que al momento de la inducción floral

este proceso se detenga, ya que según Muñoz (2020)<sup>12</sup> la planta descubre al menos dos hojas más antes de exhibir el cono floral.

Por otra parte, no hubo diferencias significativas entre tratamientos en ningún momento de muestreo. Esto puede explicarse según lo propuesto por Py *et al.* (1987) y Bartholomew *et al.* (2018), quienes mencionan que cuando el contenido de nitrógeno es superior al 1% de la materia seca, la planta reacciona produciendo hojas e incrementando sus tamaños. Dicha condición se cumplió a lo largo del ciclo vegetativo y se puede constatar en el Cuadro 15.

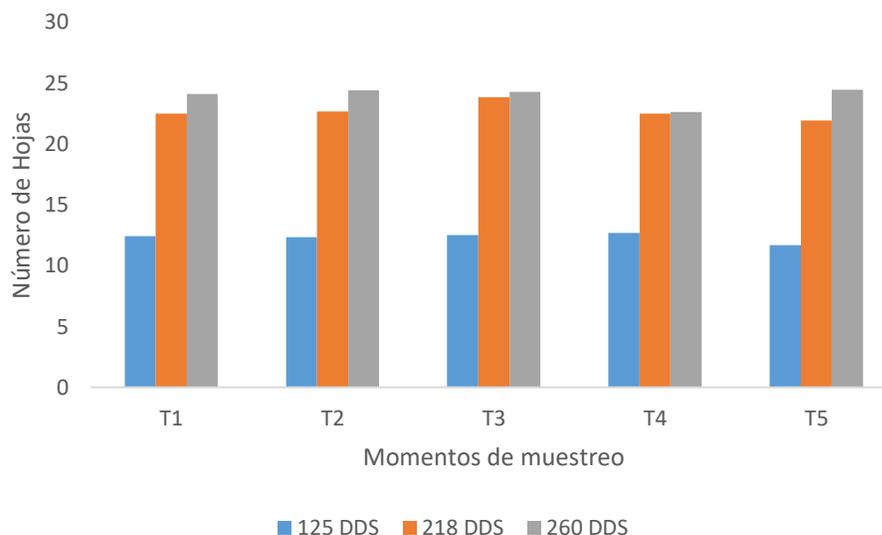
Marca (2017) encontró un total de 19 hojas emitidas a los 180 DDS. Fournier *et al.* (2010) y González *et al.* (2013) ambos obtuvieron 49 hojas a los 210 DDS; mientras que Rodríguez (2010) en 225 DDS reportó hasta 53 hojas. Las valoraciones anteriores se diferencian de las obtenidas en este estudio, posiblemente por condiciones ambientales y tamaño de hijo utilizado según lo mencionado por Bartholomew *et al.* (2018).

El analizar los días transcurridos tras la emergencia de una hoja, permitió conocer con mayor precisión el desarrollo de esta variable. A partir de los 125 DDS y hasta los 218 DDS, de manera general cada nueve días se emitió una hoja nueva, lo cual fue inferior al reportado por Fournier *et al.* (2010) quien al utilizar plantas MD-2 reporta una hoja nueva cada 11 días.

Lo acontecido sugiere que la producción de hojas no fue afectada por las combinaciones nitrógeno + *A. chroococcum* y en el caso de que se integren las demás variables en hoja, podría considerarse a los programas -20% N + Bioprotection y -30% N + Bioprotection como alternativas viables en la fertilización.

---

<sup>12</sup> Muñoz, J. 25 de febrero del 2020. Muestreos peso planta para inducción floral (entrevista). Piedra Alegre de Pital, Costa Rica. Agroindustrial Tres Amigos S.A.



**Figura 29.** Número de hojas emitidas por las plantas de piña bajo distintas dosis de nitrógeno y la adición de Bioprotection AZV-C, Agroindustrial Tres Amigos S.A., Pital, 2020.

#### 4.10 Análisis Económico de costos

Para su realización se tomó en cuenta únicamente el costo de los productos registrados hasta el último muestreo. Por lo tanto, en el Cuadro 21 no se incluyó el costo por aplicación ni otras labores que se realizaron a lo largo del ciclo preforzamiento, ya que fueron homogéneas para todos los tratamientos.

**Cuadro 21.** Análisis de costos variables dentro de los tratamientos propuestos para fertilización nitrogenada, Agroindustrial Tres Amigos S.A., Pital, 2020.

Tratamiento	Costo Foliar/ha	Ahorro Total/ha	Ahorro/Ciclo Fertilización/ha
100% N	₡1 440 479,86	-	-
-20% N + Bio*	₡1 414 979,86	₡25 500,00	₡4 250,00
-30% N + Bio*	₡1 405 493,86	₡34 986,00	₡5 831,00
-40% N + Bio*	₡1 396 007,86	₡44 472,00	₡7 412,00
-50% N + Bio*	₡1 386 521,86	₡53 958,00	₡8 993,00

\*El signo negativo referencia la reducción de nitrógeno. Bio = Bioprotection AZV-C

El costo foliar/ha se refirió la sumatoria del costo de cada uno de los productos foliares destinados a la fertilización de la planta, durante los trece ciclos de aplicación preforza con sus respectivas variantes por tratamiento (costo fijo y costo variable de los foliares).

Con la información obtenida, el tratamiento -50% N + Bioprotection fue el programa que mayor ahorro productivo generó. Sin embargo, como se observó en los resultados anteriores, promovió una tasa de crecimiento inferior en la planta durante la etapa vegetativa. Por otra parte, reducciones de 20% N + Bioprotection y 30% N + Bioprotection fueron los programas que mayormente se asemejan al desempeño de las plantas logrado con el paquete de la finca y que además generan una mayor rentabilidad.

Es probable que conforme se incremente la población de *Azotobacter chroococcum* en los suelos de la finca, la utilización de urea disminuya y con ello los costos por el uso de nitrógeno reflejados en el Cuadro 21.

## 5. CONCLUSIONES

- El programa 100% nitrógeno y las reducciones 20% nitrógeno + Bioprotection AZV-C y 30% nitrógeno + Bioprotection AZV-C permitieron obtener los mayores resultados en el crecimiento de la planta.
- A través de la aplicación del producto Bioprotection AZV-C, *Azotobacter chroococcum* logró establecerse en el suelo del área experimental, aunque se observó una disminución poblacional en un período de 93 días, a partir de la última aplicación.
- Los tratamientos con reducción de 20% nitrógeno y 30% nitrógeno son las mejores alternativas de fertilización, ya que *Azotobacter chroococcum* repuso parte del porcentaje restringido y por ello deparó tasas de crecimiento estadísticamente iguales a T<sub>1</sub> a lo largo del ciclo vegetativo en la mayoría de variables.
- Los tratamientos con reducción de 40% de nitrógeno + Bioprotection y 50% nitrógeno + Bioprotection, ofrecieron el mayor ahorro por aplicación, sin embargo, acarrearón las menores tasas de crecimiento en las plantas.

## 6. RECOMENDACIONES

- Se recomienda replicar la investigación manteniendo la reducción de nitrógeno durante toda la etapa preforza.
- De conservarse la reducción a lo largo de la etapa preforza, se sugiere realizar una quinta aplicación de Bioprotection AZV-C en el octavo ciclo de fertilización para reforzar la población de *Azotobacter chroococcum*.
- Relacionando las variables de crecimiento y el estudio económico, para la finca es posible y factible implementar el programa con reducción del 20% nitrógeno o 30% nitrógeno si se incluye el producto Bioprotection, ya que cumplen en el tiempo y necesidad de la planta para la inducción floral con lo ofrecido por el paquete empleado por la finca.
- Se sugiere establecer un ensayo bajo los mismos principios en áreas de semilleros.

## 7. LITERATURA CONSULTADA

- Aparicio-Tejo, P; Arrese-Igor, C; Becana, M. 2013. Fijación biológica de nitrógeno. *In* Azcón-Bieto, J; Talón, M (eds.). Fundamentos de fisiología vegetal. 2 ed. Madrid, España, McGraw-Hill Interamericana. 651 p.
- Bartholomew, DP; Paull, RE; Sanewski, G (eds.). 2018. The pineapple: botany, production and uses. 2 ed. Oxfordshire, UK, CABI. 325 p.
- Bertsch, F. 1998. La fertilidad de los suelos y su manejo. San José, Costa Rica, ACCS. 157p.
- Boaretto, AE; Chitolina, JC; Raij, B; Silva, FC; Tedesco, MJ; Carmo, CA. 1999. Amostragem, acondicionamento e preparação das amostras de plantas para análise química. *In* Da Silva, FC (ed.). Manual de análises químicas de solos plantas e fertilizantes. Brasilia, Brasil, Embrapa Informação Tecnológica. 627 p.
- Borda-Molina, D; Pardo-García, JM; Montaña-Lara, JS; Martínez-Salgado, MM. 2011. Influencia en la materia orgánica y *Azotobacter nigricans* en un cultivo de *Stevia rebaudiana* B. Universitas Scientiarum 16(3): 282 – 293.
- CANAPEP (Cámara Nacional de Productores y Exportadores de Piña). 2020. Estadísticas de la producción piñera en Costa Rica. (en línea). Consultado 11 abr. 2020. Disponible en: <https://canapep.com/estadisticas/>
- Castañeda, P. 2003. Seminario sobre producción y manejo post cosecha de la piña para la exportación. (en línea). San Salvador, El Salvador, VIFINEX. 63 p. Consultado el 29 abr. 2019. Disponible en: <https://www.slideshare.net/syandrea/seminario-produccionmanejopina>
- Chennappa, G; Udaykumar, N; Vidya, M; Nahajara, H; Amaresh, YS; Sreenivasa, MY. 2019. Azotobacter – A natural resource for bioremediation of toxic pesticides in soil ecosystems. *In* Shankar Singh, J; Singh, DP (eds.). New and futures developments in microbial biotechnology and bioengineering. Elsevier. 329 p.
- Córdova-Bautista; Y; Rivera-Cruz, MC; Ferrera-Cerrato, R; Obrador-Olán, JJ; Córdova-Ávalos, V. 2009. Detección de bacterias benéficos en suelo con

- banano (*Musa AAA Simmonds*) cultivar 'Gran Enano' y su potencial para integrar un biofertilizante. *Universidad y Ciencia* 25(3): 253 – 265.
- Coyne, M. 2000. *Microbiología del suelo: un enfoque exploratorio*. Rasskin, M (trad.); Rincón Córcoles, A (rev.). Madrid, España, Editorial Parainfo. 416 p. Traducción de: *Soil Microbiology: An Exploratory Approach*.
- DAF (Department of Agriculture and Fisheries, Australia). 2009. *Pineapple best practical manual*. Queensland Government. (en línea). Consultado 11 abr. 2020. Disponible en: [https://www.daf.qld.gov.au/\\_data/assets/pdf\\_file/0007/66247/Ch1-The-Pineapple.pdf](https://www.daf.qld.gov.au/_data/assets/pdf_file/0007/66247/Ch1-The-Pineapple.pdf)
- Di Rienzo J.A., Casanoves F., Balzarini M.G., Gonzalez L., Tablada M., Robledo C.W. InfoStat versión 2019. Centro de Transferencia InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina. URL <http://www.infostat.com.ar>
- Dilworth, MJ; Eady, RR; Eldridge, ME. 1988. The vanadium nitrogenase of *Azotobacter chroococcum*. *Biochemical Journal* 249: 745 – 751.
- EARTH (Escuela de Agricultura de la Región Tropical Húmeda, Costa Rica). s.f. *Fertilización Foliar*. (en línea). Consultado el 03 jun. 2019. Disponible en: <http://usi.earth.ac.cr/glas/sp/DocTecnicos/Promes/Pina6.pdf>
- Ebel, AI; Giménez, LI; González, AM; Alayón Luaces, P. 2016. Evaluación morfoanatómica de hojas "D" de piña (*Ananas comosus* (L.) Merr. var. *comosus*) en respuesta a la implantación de dos sistemas de cultivo en Corrientes, Argentina. *Acta Agronómica* 65(4): 390 – 397.
- Ehaliotis, C; Papadopoulou, K; Kotsou, M; Mari, I; Balis, C. 1999. Adaptation and population dynamics of *Azotobacter vinelandii* during aerobic biological treatment of olive-mill wastewater. *FEMS Microbiology Ecology* 30(1999): 301 – 311.
- Estupiñan-Silva, R; Quesada, B. 2010. El proceso Haber-Bosch en la sociedad agroindustrial: peligro y alternativas. *El otro derecho* 42: 75 – 96.
- FAO (Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura). 2019. FAOSTAT: Crops, Main pineapple producers in the world. (en línea).

Consultado 11 abr. 2020. Disponible en:  
<http://www.fao.org/faostat/en/#data/QC>

FAO (Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura). 2019. FAOSTAT: Crops, Pineapple in Costa Rica. (en línea). Consultado 11 abr. 2020. Disponible en: <http://www.fao.org/faostat/en/#data/QC>

FAO (Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura). 2015. Estimación de gases de efecto invernadero en la agricultura. (en línea). Roma, Italia, FAO. 193 p. Consultado el 21 may. 2020. Disponible en: <http://www.fao.org/3/a-i4260s.PDF>

Ferraris, GN; Couretot, LA; Toribio, M. s.f. Pérdidas de nitrógeno por volatilización y su implicancia en el rendimiento del cultivo de maíz: Efectos de fuente, dosis y uso de inhibidores. (en línea). Consultado el 03 jun. 2019. Disponible en: [http://www.ipni.net/publication/ia-lacs.nsf/0/B5B2034B84BF8FF6852579950075F445/\\$FILE/19.pdf](http://www.ipni.net/publication/ia-lacs.nsf/0/B5B2034B84BF8FF6852579950075F445/$FILE/19.pdf)

Fournier, P; Dubois, C; Benneveau, A; Soler, A. 2010. Growth indicators of different pineapple cultivars compared with current standard 'Smooth Cayenne' in West Africa and Reunion Island: A first step to toward modeling growth. *Agronomy Journal* 102(6): 1572 – 1577.

Gambin, JS; Herrera, D. 2012. Curva de absorción de nutrientes en el cultivo de la piña (*Ananas comosus* VAR. MD-2). *Tierra Tropical* 8(2): 169 – 178.

Gamboa Barboza, AM. 2006. Efecto del peso de la planta al forzamiento sobre el rendimiento y calidad de la fruta en piña (*Ananas comosus*) (L.) Merr híbrido MD- 2. Tesis Lic. Santa Clara, Costa Rica, Instituto Tecnológico de Costa Rica. 102 p.

Garita Coto, RA. 2014. La Piña. Cartago, Costa Rica, Editorial Tecnológica de Costa Rica. 566 p.

Geddes, BA; Oresnki, IJ. 2016. The mechanism of symbiotic nitrogen fixation. *In* Hurst, CJ (ed.). The mechanistic benefits of microbial symbionts. *Advances in environmental microbiology*, vol 2. Cham, Suiza, Springer. v.2, 315 p.

- González Leguizamón, R; Chabbal, M; Dominguez, JF; Mazza, S; Alayón Luaces, P. 2013. Ciclo vegetativo de plantas de ananá (*Ananas comosus* L. Merr.) bajo dos sistemas de cultivo en corrientes. *FACENA* 29: 11-22.
- Halbleib, CM; Ludden, PW. 2000. Regulation of biological nitrogen fixation. *The Journal of Nutrition* 130(5): 1081 – 1084.
- Hanafi, MM; Selamat, MM; Husni, MHA; Adzemi, MA. 2012. Dry matter and nutrient partitioning of select pineapple cultivars grown on mineral and tropical peat soils. *Communications in Soil Science and Plan Analysis* 40: 3263 – 3280.
- Herrera, W. 2001. Manejo de suelos y fertilización del cultivo de piña (*Ananas comosus*) (L) Merr. *In* Molina, E; Meléndez, G (eds.). *Fertilidad de suelos y manejo de la nutrición de los cultivos en Costa Rica*. San José, Costa Rica, Centro de Investigaciones Agrícolas (CIA) – UCR. 139 p.
- Hirzel C; J. 2009. Principios básicos de fertirrigación. *In* INIA (Instituto de Investigaciones Agropecuarias, Chile). *Boletín del Nodo de riego en el seco, Región de O'Higgins*. Litueche, Chile. N.º190.
- Jahn, R; Blume, HP; Asio, VB; Spaargaren, O; Schad, P. 2009. *Guía para la descripción de suelos*. Roma, Italia, FAO. 99 p.
- Jiménez Díaz J. 1999. *Manual práctico para el cultivo de piña de exportación*. Cartago, Costa Rica, Editorial Tecnológica de Costa Rica. 224 p.
- Jiménez-Vicente, E; Sánchez Martín del Campo, J; Yang, ZY, Cash, VL; Dean, DR; Seefeldt, LC. 2018. Application of affinity purification methods for analysis of the nitrogenase system for *Azotobacter vinelandii*. *In* Galluzzi, L; Rudqvist, NP (eds.). *Methods in enzymology*, vol 365. Elsevier.
- Jones Jr, J; Case, VW. 1990. Sampling, handling and analyzing plant tissue samples. *In* Westerman, RL (ed.). *Soil testing and plant analysis*. 3 ed. USA, Soil Science Society of America. 677 p.
- Jones Jr, JB; Wolf, B; Mills, HA. 1991. *Plant analyses handbook: a practical sampling, preparation, analyses and interpretation guide*. USA, Micro-Macro Publishing. 213 p.
- Jones, C; Brown, BD; Engel, R; Horneck, D; Olson-Rutz, K. 2013. Factors affecting nitrogen fertilizer volatilization. (en línea). Consultado el 21 may. 2020.

Disponible

en:

[http://landresources.montana.edu/soilfertility/documents/PDF/pub/UvolfactE\\_B0208.pdf](http://landresources.montana.edu/soilfertility/documents/PDF/pub/UvolfactE_B0208.pdf)

- Kafkafi, U; Tarchitzky, J. 2012. Fertirrigación una herramienta para una eficiente fertilización y manejo del agua. París, Francia, IFA. 151 p.
- Kumar Das, H. 2019. *Azotobacter* as biofertilizer. In Gadd, GM; Sariaslani, S (eds.). Advances in applied microbiology, vol 108. Elsevier. v.108, 161 p.
- Kumari, S; Chourasia, SK; Singh, U; Rajnikant. 2017. *Azotobacter*: Its role in sustainable agriculture. New Agriculturist 28(2): 485 – 492.
- Lassaletta, L; Billen, G; Grizzetti, B; Anglade, J; Garnier, J. 2014. 50 year trends in nitrogen use efficiency of world crop systems: the relationship between yield and nitrogen input to cropland. Nitrogen: Ammonium vs nitrate uptake and regulation, 2019, San José, Costa Rica. París, Francia, Environmental Research Letters 9: 1 – 9.
- Lea, PJ. 1997. Primary nitrogen metabolism. In Dey, PM; Harbone, JB (eds.). Plant Biochemistry. Elsevier. 554 p.
- Leal Pinto, F; Coppens D'Eeckenbrugge, G; Avilán Rovira, L; Medina, E. 2010. La piña de las Américas o Ananás. Caracas, Venezuela, Universidad Central de Venezuela. 417 p.
- Lozada V, LdC; Rivas V, CY. 2010. Evaluación del efecto de la inoculación con *Azotobacter* spp en plantas de ají dulce (*Capsicum frutescens*). Tesis Tec. Trujillo, Venezuela, Universidad de Los Andes Núcleo Universitario "Rafael Ángel". 56 p.
- Lucini, EI; Merlo, C; Noé, LB; Bruno, M; Vázquez, C; Dubini, L; Ocampo, A; Camiletti, B; Martín, MP; Solloum, S. 2014. Complemento teórico de microbiología agrícola. (en línea). Universidad Nacional de Córdoba, España. 212 p. Consultado el 11 abr. 2020. Disponible en: <http://agro.unc.edu.ar/~microbiologia/wp-content/uploads/2014/04/2-Complemento-te%C3%B3rico.pdf>
- Ludewig, U. 2019. Nutritional Physiology of Crops Plants, Nitrogen: Ammonium vs Nitrate uptake and regulation. University of Hohenheim, Germany.

- Mahato, S; Kafle, A. 2018. Comparative study of *Azotobacter* with or without other fertilizers on growth and yield of wheat in Western Hills of Nepal. *Annals of Agrarian Science* 16(2018): 250 – 256.
- Malavolta, E. 1992. ABC da análise de solos e folhas: amostragem, interpretação e sugestões de adubação. São Paulo, Brasil, Agronômica Ceres. 124 p.
- Malavolta, E; Vitti, GC; Oliveria, SA. 1989. Avaliação do estado nutricional das plantas: princípios e aplicações. Paracibá, Brasil, Associação Brasileira Para Pesquisa da Potassa e do Fósforo. 201 p.
- Maldonado, JM. 2013. Asimilación del nitrógeno y el azufre. *In* Azcón-Bieto, J; Talón, M (eds.). *Fundamentos de fisiología vegetal*. 2 ed. Madrid, España, McGraw-Hill Interamericana. 651 p.
- Marca Huamancha, CE. 2017. Fertilización mineral y biofertilización en piña (*Ananas comosus* L. Merr.) cv. “Golden” en Río Negro (Satipo). Tesis Bach. Lima, Perú, Universidad Nacional Agraria La Molina. 94 p.
- Molina, E, Meléndez, G. 2002. Tabla de interpretación de análisis de suelos. (en línea). Consultado el 28 abr. 2020. Disponible en: <http://www.cia.ucr.ac.cr/pdf/Memorias/Tablas%20Interpretaci%C3%B3n%20An%C3%A1lisis%20Foliar.pdf>
- Molina, E. 2003. Características y manejo de fertilizantes que contienen nitrógeno, fósforo y potasio. *Fertilizantes: Características y Manejo* (3, 2003, San José, Costa Rica). San José, Costa Rica, Centro de Investigaciones Agronómicas de la Universidad de Costa Rica. 139 p.
- Molina, E. 2008. Análisis de suelo y su interpretación. (en línea). Consultado el 28 de abr. 2020. Disponible en: <http://www.infoagro.go.cr/Inforegiones/RegionCentralOriental/Documents/Suelos/SUELOS-AMINOGROWanalisisinterpretacion.pdf>
- Molina, E; Espinosa, J. 1999. Acidez y enclavado de los suelos. International Plant Nutrition Institute (IPNI). 42 p.
- Newton, WE. 2007. Physiology, biochemistry, and molecular biology of nitrogen fixation. *In* Bothe, H; Ferguson, SJ (eds), Newton, WE. *Biology of nitrogen cycle*. Elsevier. 452 p.

- Noar, JD; Bruno-Bárcena, JM. 2018. *Azotobacter vinelandii*: the source of 100 years of discoveries and many more to come. *Microbiology* 164: 421 – 436.
- Novoa, R; Loomis, RS. 1981. Nitrogen and plant production. *Plant and soil* 58: 177-204.
- OGTR (Office of the Gene Technology Regulator, Australia). 2008. *The Biology of Ananas comosus var. Comosus* (Pineapple). Australia Government. 43 p.
- Ortiz Miranda, RI. 2013. Evaluación de dosis y fuentes de enmiendas calcáreas en la fertilidad del suelo y crecimiento de piña en finca Tres Amigos, Pital, San Carlos. Tesis Lic. Santa Clara, Costa Rica, Instituto Tecnológico de Costa Rica. 94 p.
- Peña, A; Díaz, A; Martínez, T. 1996. *Fruticultura Tropical*. Bogotá, Colombia, Instituto Colombiano para el Fomento de la Educación Superior. 84 p.
- Pereira dos Santos, M; Martins Maia, V; Soares Oliveria, F; Facco Pegoraro, R; Rodrigues dos Santos, S; Aspiazú, I. 2018. Estimativa da área foliar total e da área da folha D do abacaxizeiro a partir de características biométricas. *Revista Brasileira de Fruticultura* 40(6).
- Pérez Álvarez, S; Coto Arbelo, O; Echemendía Pérez, M; Ávila Quezada, G. 2015. *Pseudomonas fluorescens* Miguela, ¿control biológico o patógeno? *Protección Vegetal* 30(3): 225 – 234.
- Picado Rojas, JL. 2010. Programa para la producción de piña orgánica. (en línea). San José, Costa Rica, Impresiones Almerrique, S.A. 36 p. Consultado el 03 jun. 2019. Disponible en: [http://www.pnp.cr/sites/default/files/picado\\_j.2010.programa\\_para\\_la\\_produccion\\_de\\_pina\\_organica\\_fundecooperacion\\_programa\\_para\\_la\\_cooperacion\\_sur-sur\\_benin\\_butan\\_costa\\_rica\\_y\\_acicafoc.pdf](http://www.pnp.cr/sites/default/files/picado_j.2010.programa_para_la_produccion_de_pina_organica_fundecooperacion_programa_para_la_cooperacion_sur-sur_benin_butan_costa_rica_y_acicafoc.pdf)
- PROCOMER Costa Rica. 2019. Principales resultados del sector exportador 2018. (en línea). Consultado el 11 abr. 2020. Disponible en: <https://procomer.com/downloads/estudios/ResumenAnuario2018.pdf>.
- PROCOMER Costa Rica. 2020. Anuario Estadístico, Perfil de exportación según producto: Piña. (en línea). Consultado el 11 abr. 2020. Disponible en: [https://procomer.com/es/red/anuario\\_estadistico3](https://procomer.com/es/red/anuario_estadistico3).

- Py, C; Lacoeyllhe JJ; Teisson, C. 1987. The pineapple cultivations and uses. París, Francia, Étidions G.-P. Maisonneuve y Larose. 551 p.
- Rebolledo MA. 1992. Análisis del crecimiento y nutrición de la piña en su fase vegetativa en el Bajo Papaloapan. Tesis. Montecillo, Mexico, Colegio de Postgraduados 119 p.
- Rebolledo-Martínez, A; Del Ángel Pérez, AL; Becerril Román, AE; Rebolledo-Martínez, L. 2005. Growth analysis for three pineapples cultivars grown on plastic mulch and bare soil. *Interciencia* 30(12): 758 – 763.
- Reuter, D; Robinson, JB. 1988. Plant analyses: an interpretation manual. Melbourne, Australia, Inkata Press. 218 p.
- Rivera, D; Camelo, M; Estrada, G; Obando, M; Bonilla, R. 2010. Efecto de diferentes plaguicidas sobre el crecimiento de *Azotobacter chroococcum*. *Revista Colombiana de Biotecnología* 12(1): 94 – 102.
- Rodríguez Gómez, JA. 2010. Efecto de fuentes de nitrógeno de origen orgánico a diferentes dosis en el cultivo de piña (*Ananas comosus*), (L) Merr. Híbrido MD-2 cultivada bajo técnicas orgánicas. Tesis Lic. Santa Clara de San Carlos, Costa Rica, Instituto Tecnológico de Costa Rica. 93 p.
- Rojas Ramírez, JM. 2018. Efecto de la fertilización post forzamiento sobre la calidad y el rendimiento de la fruta de piña (*Ananas comosus* (L.) Merr.) híbrido MD-2 Alajuela, Costa Rica. Tesis Lic. Santa Clara, Costa Rica, Instituto Tecnológico de Costa Rica. 87 p.
- Romero, N. 1997. Métodos de análisis para la determinación de nitrógeno y constituyentes nitrogenados en alimentos. *In* FAO. Producción y manejo de datos de composición química de alimentos en nutrición. Santiago, Chile, Universidad de Chile. 356 p.
- Sánchez-López, DB; Pérez Pazos, JV; Luna Castellanos, LL; García Peña, JA; Espitia Montes, AA. 2018. Evaluación de *Azotobacter vinelandii* y *Pseudomonas denitrificans* en *Dioscorea rotundata* en condiciones de campo. *Revista de la Facultad de Ciencias Agrarias* 17(1): 35 – 43.
- Sánchez-López, DB; Pérez-Pasos, JV; Luna-Castellanos, LL; García-Peña, JA; Espitia-Montes, AA. 2019. *Azotobacter chroococcum* y *Azospirillum lipoferum*

- como bioestimulantes en el cultivo de *Ipomoea batatas* Lam. *Agronomía Mesoamericana* 30(2): 563 – 576.
- Shahid, M; Zaidi, A; Ehtram, A; Saghir Khan, M. 2019. *In vitro* investigation to explore the toxicity of different groups of pesticides for an agronomically important rhizosphere isolated *Azotobacter vinelandii*. *Pesticide Biochemistry and Physiology* 157(2019): 33 – 44.
- Shirinbayan, S; Khosravib, H; Jafar Malakouti, M. 2019. Alleviation of drought stress in maize (*Zea mays*) by inoculation with *Azotobacter* strains isolated from semi-arid regions. *Applied Soil Ecology* 133(2019): 138 – 145.
- Siebeneichler, SC; Monnerat, PH; Cordeiro de Carvalho, AJ; Accácio da Silva, J. 2000. Composição mineral da folha em abacaxizeiro: efeito da parte da folha analisada. *Revista Brasileira de Fruticultura* 24(1): 194-198.
- Sinha, S; Aman, A; Rajan, J. 2018. The significance of D leaf in pineapple. *Biomolecule Reports* ISSN: 2456-8759.
- Sivasakthi, S; Saranraj, P; Sivasakthivelan, P. 2017. Biological nitrogen fixation by *Azotobacter* sp. a review. *Indo – Asian Journey of Multidisciplinary Research* 3(5): 1274 – 1284.
- Snyder, FW; Carlson, GE. 1984. Selecting of partitioning of photosynthetic products in crops. *In* Brady, NC (ed.). *Advances in Agronomy*, vol 37. Elsevier. v.137, 467 p.
- Soto-Urzúa, L; Baca, BE. 2001. Mecanismos de protección de la nitrogenasa a la inactivación por oxígeno. *Revista Latinoamericana de Microbiología* 43: 37 – 49.
- Subedi, R; Khanal, A; Aryal, K; Chhetri, LB; Kandel, BP. 2019. Response of *Azotobacter* in cauliflower (*Brassica oleracea* L. var. *botrytis*) production at Lamjung, Nepal. *Acta Scientifica Malaysia* 3(1): 17 – 20.
- Sung Gee, C; Pfeffer, JT; Suidan, MT. 1990. Nitrosomas and nitrobacter interactions in biological nitrification. *Journal of Environmental Engineering* 116(1): 4 – 17.
- Tomer, S; Chandra Suyal, D; Goel, R. 2016. Biofertilizers: A timely to approach for sustainable agriculture. *In* Choudhary, K; Varma, A; Tuteja, N (eds.). *Plant-*

Microbe interaction: An approach to sustainable agriculture. Singapore, Springer. 509 p.

Wani, SA; Chand, S; Wani, MA; Ramzan, M; Hakeem, KR. 2016. *Azotobacter chroococcum* – A potencial biofertilizer in Agriculture: An Overview. Soil Science: Agricultural and Environmental Perspectives. 333-348.

Zehr, JP; Montoya, JP. 2007. Measuring N<sub>2</sub> fixation in the field. *In* Bothe, H; Ferguson, SJ, Newton, WE (eds). Biology of nitrogen cycle. Elsevier. 452 p.

Zhang, J. and Bartholomew, D.P. (1997). Effect of plant population density on growth and dry-matter partitioning of pineapple. *Acta Horticulturae* 425: 363-376.

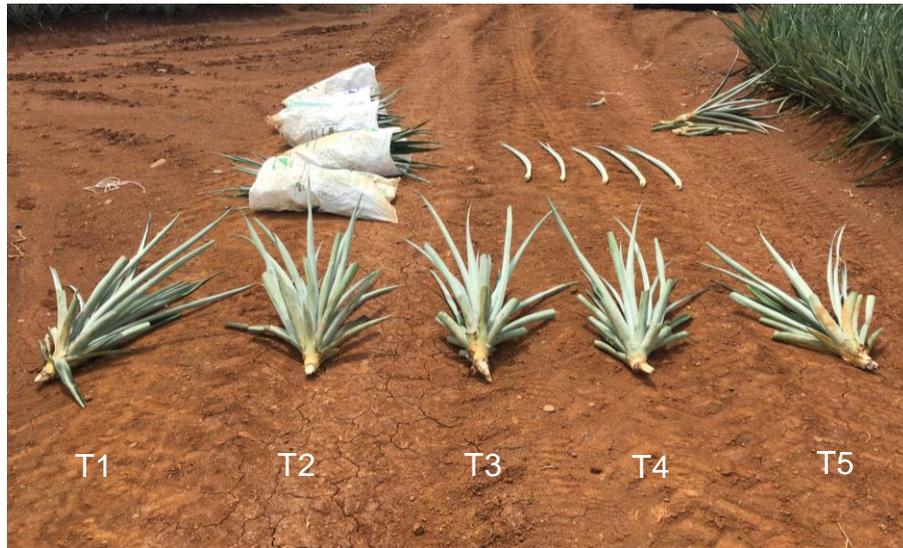
## 8. ANEXOS



Anexo 1. Identificación de los tratamientos en el área experimental, Agroindustrial Tres Amigos S.A., Pital, 2020.



Anexo 2. Aplicación del paquete tecnológico comercial con el spray boom en el área experimental, Agroindustrial Tres Amigos S.A., Pital, 2020.



Anexo 3. Muestreo en el área experimental a los 125 DDS, Agroindustrial Tres Amigos S.A., Pital, 2020.



Anexo 4. Pérdida de zonas muestrales a los 260 DDS a causa de *Phytophthora sp.* y floración natural, Agroindustrial Tres Amigos S.A., Pital, 2020.



Anexo 5. Práctica cultural de chapia realizada a los 160 DDS como prevención hacia la floración natural, Agroindustrial Tres Amigos S.A., Pital, 2019.

Anexo 6. Fuentes de variación y grados de libertad para el diseño de bloques completos al azar, Agroindustrial Tres Amigos, S.A., Pital, 2019.

<b>Fuentes de variación</b>	<b>Grados de libertad</b>
Bloques	3
Tratamientos	4
Error experimental	13
Total	20