

**INSTITUTO TECNOLOGICO DE COSTA RICA  
ESCUELA DE BIOLOGIA  
CARRERA DE INGENIERIA EN BIOTECNOLOGIA**

**ALMACIGOS PACAYAS, EUROSEMILLAS**

**LABORATORIO DE MICROBIOLOGIA AGRICOLA  
CENTRO DE INVESTIGACIONES AGRONOMICAS  
UNIVERSIDAD DE COSTA RICA**

**DESARROLLO DE UN METODO ALTERNATIVO DE  
PRODUCCION DE ALMACIGOS CON BACTERIAS FIJADORAS  
DE NITROGENO**

**INFORME DE PROYECTO DE GRADUACION PARA OPTAR POR EL  
GRADO DE BACHILLER EN INGENIERIA EN BIOTECNOLOGIA**

**MARTA ELENA RAMIREZ OROZCO**

**CARTAGO  
ENERO, 2004**

# DESARROLLO DE UN MÉTODO ALTERNATIVO DE PRODUCCIÓN DE ALMACIGOS DE TOMATE CON BACTERIAS FIJADORAS DE NITRÓGENO

MARTA ELENA RAMÍREZ OROZCO\*

## RESUMEN

*Azospirillum sp* es una bacteria de vida libre, fijadora de nitrógeno en condiciones microaerofílicas y que promueve el crecimiento en muchos cultivos de importancia agronómica.

Se realizó un ensayo en tomate DRD 8108 a nivel de invernadero en Almacigos Pacayas, para desarrollar un método de producción de semilleros en el que se utilice un biofertilizante a base de esta bacteria. Se compararon los resultados con un control sin fertilización, un control químico con un fertilizante de liberación controlada y un control biológico con un biofertilizante comercial a base de *Azotobacter sp*.

A pesar de la superioridad de la fertilización química en cuanto a crecimiento longitudinal y área foliar, se destacan las ventajas del uso de biofertilizantes como estimuladores radicales y bioprotectores frente al ataque de patógenos.

Dentro del ensayo se incluyó el establecimiento de un método de producción del biofertilizante líquido de *Azospirillum lipoferum*, utilizando una suspensión celular para mejorar la capacidad de colonización de la rizosfera.

Se concluye que al inocular un sustrato con altas concentraciones de bacterias (biofertilizantes) se produce un cambio en las poblaciones de los mismos y hay un efecto positivo sobre la sanidad vegetal, aunque no se observaron beneficios en cuanto a crecimiento.

**Palabras clave:** *Azospirillum*, biofertilizante, fijadores de nitrógeno, tomate.

---

\* Informe de Práctica de Especialidad, Escuela de Biología, Instituto Tecnológico de Costa Rica, Cartago, Costa Rica, 2003.

## **AGRADECIMIENTOS**

Al Ing. Orlando Ramírez por su confianza y apoyo en el desarrollo de este proyecto, igualmente al personal de Almácigos Pacayas por su colaboración.

A los funcionarios del Laboratorio de Microbiología Agrícola del Centro de Investigaciones Agronómicas, muy especialmente a la Dra Lidieth Uribe, Ing Marena Chavarría y al Ing Walter Hernández por sus consejos y colaboración en las labores de laboratorio.

## INDICE GENERAL

<b>RESUMEN</b>	2
<b>AGRADECIMIENTOS</b>	3
<b>INDICE GENERAL</b>	4
<b>INDICE DE CUADROS</b>	5
<b>INDICE DE FIGURAS</b>	6
<b>INDICE DE ANEXOS</b>	7
<b>INTRODUCCIÓN</b>	8
<b>OBJETIVOS</b>	9
<b>REVISION DE LITERATURA</b>	10
El suelo	11
<i>Generalidades</i>	11
<i>Disponibilidad de nutrientes</i>	11
<i>Fracción orgánica</i>	12
<i>El suelo como hábitat de microorganismos</i>	13
<i>Microorganismos y enzimas del suelo</i>	13
La Fertilización	14
<i>Generalidades</i>	14
<i>Importancia del nitrógeno en las plantas</i>	14
<i>Incorporación del nitrógeno en las plantas</i>	15
<i>Efecto de la fertilización nitrogenada sobre la nutrición humana</i>	16
Ciclo del nitrógeno	17
<i>Generalidades de los ciclos biogeoquímicos</i>	17
<i>Generalidades del ciclo del nitrógeno</i>	17
<i>Fijación de nitrógeno</i>	18
<i>Nitrificación</i>	22
<i>Inmovilización</i>	23
<i>Desnitrificación</i>	23
Bacterias fijadoras de nitrógeno	24
<i>Azotobacter spp</i>	24
<i>Azospirillum spp</i>	25
Agricultura Orgánica	26
<i>Productos biológicos: biofertilizantes ventajas y desventajas</i>	26
<b>MATERIALES Y MÉTODOS</b>	28
Evaluación de las cepas	28
Desarrollo del biofertilizante	28
Pruebas al sustrato	30
Ensayo de invernadero	30
Comprobación de la infección de la raíz	32
<b>RESULTADOS</b>	34
<b>DISCUSIÓN DE RESULTADOS</b>	43
<b>CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES</b>	51
<b>BIBLIOGRAFÍA</b>	53
<b>ANEXOS</b>	56

## INDICE DE CUADROS

<b>Cuadro 1.</b> Características del fertilizante químico Osmocote y del biofertilizante Fertibiol.	30
<b>Cuadro 2.</b> Resultados obtenidos en los recuentos y transmitancia de cada cepa en caldo nutritivo dos días a temperatura ambiente en agitación constante.	34
<b>Cuadro 3.</b> Resultados obtenidos en la medición del crecimiento del caldo NFb con concentraciones crecientes de glucosa inoculado con <i>A. Lipoferum</i> .	35

## INDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Etapas en la fijación de nitrógeno: Reducción de $N_2$ a $2NH_3$	21
<b>Figura 2.</b> Distribución de la siembra en la bandeja de 128 huecos	31
<b>Figura 3.</b> . Tinción de Gram para <i>A. Lipoferum</i> de cepas crecidas en caldo nutritivo dos días a temperatura ambiente y en agitación constante.	35
<b>Figura 4.</b> . Recuentos realizados a los sustratos y tratamientos del ensayo de campo al momento de la siembra.	36
<b>Figura 5.</b> Crecimiento de las plántulas de tomate en invernadero	38
<b>Figura 6.</b> Diferencias en el recuento inicial y el final en agar nutritivo y NFb.	39
<b>Figura 7.</b> Resultados del contenido de humedad por tratamientos al final del ensayo en el Invernadero.	39
<b>Figura 8.</b> Porcentaje de materia seca de las plantas de cada tratamiento	40
<b>Figura 9.</b> Velo de crecimiento en NFb semisólido	41

## INDICE DE ANEXOS

<b>ANEXO 1.</b> Principales enzimas del suelo y su actividad	56
<b>ANEXO 2.</b> Ciclo biogeoquímico del nitrógeno	57
<b>ANEXO 3.</b> Algunos microorganismos fijadores de nitrógeno	58
<b>ANEXO 4.</b> Características de algunos fijadores de N <sub>2</sub>	59
<b>ANEXO 5.</b> Composición de los medios de cultivo	59
<b>ANEXO 6.</b> Metodología utilizada para hacer los recuentos a muestras sólidas y líquidas	60
<b>ANEXO 7.</b> Preparación de buffer fosfato 34 mM a pH 6.1	60
<b>ANEXO 8.</b> Medición de pH de una muestra de suelo	60
<b>ANEXO 9.</b> Distribución espacial de las parcelas experimentales y sus repeticiones	61
<b>ANEXO 10.</b> Resultados obtenidos a lo largo del desarrollo del biofertilizante	62
<b>ANEXO 11.</b> Resultados de la prueba de Tukey para todos los tratamientos, en el caso de la variable longitud hasta el ápice.	63
<b>ANEXO 12.</b> Resultados de la prueba de Tukey para todos los tratamientos, en el caso de la variable ancho de hoja.	65

## INTRODUCCIÓN

La necesidad de sustituir la agricultura a base de agroquímicos por una forma de cultivo orgánico, ha llevado a la investigación y el desarrollo de nuevos productos con un impacto mínimo para el ambiente y que permita mantener o aumentar los rendimientos de los cultivos.

*Azospirillum sp* ha sido el objetivo de numerosos estudios por su capacidad de fijar nitrógeno asociado con las raíces de diversos cultivos de importancia agronómica (Dobbelaere, et al; 2001). Se ha utilizado para aumentar la germinación y crecimiento en *Quercus ithaburensis* (roble) debido a su capacidad de acrecentar la cantidad de agua y minerales disponibles, incrementando la acumulación de materia seca, el área superficial de las raíces, diámetro radical, densidad y largo de los pelos radicales (Zaady & Perevolotsky, 1995).

Se ha reportado que esta bacteria puede ser de vida libre o asociada con las raíces de los cereales, pastos y plantas tuberosas (Krieg & Döbereiner, 1984). También existen revisiones en las que se menciona el uso de *Azospirillum sp* como un biocontrolador, ya que tiene la habilidad de producir sustancias antibacteriales como bacteriocinas y sideróforos (Tapia, Mascarua & Caballero, 1990), y también debido a la capacidad de reproducirse en grandes cantidades bajo condiciones de alta humedad relativa, desplazando a los patógenos por la competencia generada o por la fortaleza fisiológica que adquiere la planta (Bashan & Bashan, 2002).

Diferentes estudios han mostrado que *A. brasilense* tiene la habilidad para adherirse a las raíces de plantas gramíneas como el mijo (*Pennisetum purpureum*), *Digitaria decumbens*, trigo, maíz (*Zea mays*), así como a las raíces de plantas de otras familias que incluyen al algodón y tomate, e incluso a superficies inertes como poliestireno y arena (Caballero, 2001; Bashan, Y, 1998).

Entre las características de *Azospirillum lipoferum* destacan el que es fijadora de nitrógeno bajo condiciones microaerófilas, aunque bajo severas limitaciones de oxígeno el nitrato es disimilado a nitrógeno gaseoso. Cuando esta bacteria se pone a crecer en condiciones subóptimas produce altos niveles de poly- $\beta$ -hydroxybutyrato (gránulos de PHB), que es una fuente intracelular de energía y compuestos carbonados. De aquí nace la importancia de inducirlos durante la fase de producción del biofertilizante, ya que estos gránulos constituyen un mecanismo que favorece el establecimiento, proliferación y sobrevivencia de los organismos en ambientes competitivos como el suelo (Kadouri, Jurkevitch & Okon, 2003).

El tomate es una de las hortalizas de mayor consumo en nuestro país y que requiere del crecimiento en almácigos durante su primera etapa fenológica, para luego ser transplantado al campo. Ante la necesidad de nuevas tecnologías para la producción de hortalizas en forma orgánica y para mejorar la calidad del servicio que se brinda, Almácigos Pacayas, en la zona norte de Cartago, se ha dado la tarea de innovar en el proceso de producción de este cultivo.

Este estudio se realizó en los meses de Setiembre-Noviembre del 2003, con el fin de comparar el sistema químico con el biológico a nivel de invernadero.

## **OBJETIVO GENERAL**

1. Desarrollar un método alternativo de fertilización en almácigos de *Licopersicom esculentum* mediante la utilización de bacterias fijadoras de nitrógeno.

## **OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

1. Desarrollar un biofertilizante a base de *Azospirillum lipoferum* de forma que se pueda utilizar como fertilizante de aplicación por aspersion.
2. Determinar diferencias entre la utilización de bacterias fijadoras de nitrógeno y el sistema convencional de manejo de almácigos de *Licopersicom esculentum* en invernadero.
3. Evaluar el desarrollo de las plantas mediante la valoración del crecimiento en forma cuantitativa y cualitativa.
4. Mejorar las condiciones del sustrato que se utiliza en el invernadero, para que facilite el crecimiento de las bacterias sin afectar el desarrollo de las plantas.

## **REVISION DE LITERATURA**

### **A. EL SUELO**

#### **1. Generalidades**

Independientemente del tipo de planta que se trate, éstas necesitan crecer y desarrollar tejidos en forma óptima, y este sistema de producción está ligado a la especie, su potencial genético y al clima (Kass, 1998).

Muchos factores afectan el desarrollo vegetativo de una planta, como los ligados al ambiente edáfico o climático, o factores internos propios del organismo vegetal. Las condiciones agroecológicas, que son factores ligados al ambiente, incluyen parámetros como el suelo y el clima (Kass, 1998).

#### **2. Disponibilidad de nutrientes**

La disponibilidad de los 16 elementos de importancia para la nutrición de las plantas, así como de algunos específicos como el cobalto y el silicio, puede ser afectada por factores ligados al suelo como el pH, el tipo de arcilla, el contenido de materia orgánica y las formas de humus que predominen, la actividad de microorganismos, el contenido de agua y la fuente de fertilizante aplicada (Kass, 1998).

La adsorción de iones amonio ocurre más rápidamente a valores de pH neutros en el suelo, aproximadamente en el ámbito de 6.5-7.0. La absorción se reduce si en el suelo hay valores de pH menores a 5.5 unidades. Los niveles tóxicos de nitritos con forma iónica, se relacionan con altos niveles de pH y altos contenidos de amonio. Cuando en el suelo existen valores de pH cercanos a 7.5, el potencial de oxidar amonio a nitrito es mayor que el potencial de oxidar el nitrito a nitrato (Kass, 1998).

La acidez del suelo puede tener influencia marcada sobre la desnitrificación, porque muchas de las bacterias que participan en este proceso, son sensibles a valores de pH ácidos (Kass, 1998).

El nitrógeno puede ser mineralizado o inmovilizado en el suelo, con base en la proporción o relación entre el Carbono y el Nitrógeno (relación C:N), que exista en los residuos orgánicos o en las sustancias húmicas (Kass, 1998).

Durante las fases iniciales de la descomposición de la materia orgánica fresca, se produce un aumento en el número de microorganismos heterótrofos, acompañados por la evolución de grandes cantidades de CO<sub>2</sub>. Si la relación C:N de la materia fresca es mayor que 30:1, habrá inmovilización de N. Conforme sigue la descomposición la proporción de C:N en los residuos orgánicos disminuye, y también la disponibilidad de energía. Una parte de la población microbiana muere debido a la baja disponibilidad de alimentos y se establece un nuevo equilibrio, acompañado por una liberación (mineralización) de N, con el siguiente resultado: el nivel de nitrógeno final puede ser mayor que el nivel original. Para proporciones C:N entre 20 y 30, no hay ni inmovilización ni liberación de N mineral. Si las materias orgánicas tienen una relación C:N menor que 20:1, hay liberación de nitrógeno mineral al inicio del proceso de descomposición (Kass, 1998).

### **3. Fracción orgánica**

La parte más estable de la materia orgánica se denomina humus, una fracción que se obtiene después que se ha descompuesto la mayor parte de las sustancias animales y vegetales incorporados al suelo. En la mineralización, las sustancias sufren un proceso de degradación de sus componentes elementales: proteínas, carbohidratos, vitaminas y minerales (Kass, 1998).

El componente básico de las células vegetales es el carbono y éste también es su principal alimento. La materia orgánica en descomposición libera gran cantidad de CO<sub>2</sub> y los carbohidratos producidos por la descomposición de ésta

son asimilados por las raíces. El CO<sub>2</sub> al disolverse en el agua se transforma ácido carbónico, el mayor solvente natural para los minerales necesarios como alimento de las plantas (Hernández, 1996).

En realidad, se supone que si se provee a la planta del abono orgánico y el agua necesaria, ella misma, y a merced de los procesos biológicos y del suelo, obtendrá los minerales que necesita, pues la reserva de NPK (nitrógeno-fósforo-potasio) de un suelo vivo, trabajando biológicamente, es inagotable, y son las exudaciones radicales y microbianas las que solubilizan y movilizan esos minerales que luego son asimilados por las plantas (Hernández, 1996)

#### **4. El suelo como hábitat de microorganismos**

En un sistema de cultivo en laboratorio o en el ambiente natural, los factores físicos y químicos gobiernan el crecimiento y actividad microbiana, igualmente en los suelos se deben de tomar en cuenta estos factores. Entre los factores físicos se incluye la temperatura pero también la presión osmótica, tensión superficial, viscosidad, radiación, entre otros. En el ambiente químico de los suelos se incluye la actividad del agua, pH, la calidad y cantidad de nutrientes orgánicos e inorgánicos y gases, promotores e inhibidores del crecimiento, y el potencial de oxidación y reducción (Lynch, 1983).

#### **5. Microorganismos y enzimas del suelo**

Se conocen muchos microorganismos del suelo, y se pueden distinguir claramente en procariotas (bacterias y algas azul verdosas) y eucariotas (hongos, algas y protozoos). Los hongos son el grupo que más contribuye a la biomasa del suelo y representa cerca del 70% del peso seco. Las bacterias pueden en algunas circunstancias pueden ser los más importantes de la rizosfera (Lynch, 1983).

Algunos géneros importantes de bacterias presentes en el suelo son: *Arthrobacter*, *Azotobacter*, *Bacillus*, *Clostridium*, *Chondromyces*, *Cytophaga*,

*Micrococcus*, *Nitrosomas*, *Pseudomonas* y *Rhizobium*. Algunos géneros de actinomicetes en el suelo son *Micromonospora*, *Nocardia*, *Streptomyces*, *Streptosporangium* y *Thermactinomyces* (Lynch, 1983).

Además han sido encontradas más de 50 enzimas activas en los suelos, incluyendo oxidoreductasas, hidrolasas y transferasas. En algunas investigaciones se ha encontrado correlación entre el número de microorganismos y la actividad enzimática, pero en ocasiones aparece independiente a la actividad microbiana. En el anexo 1 se puede observar las principales enzimas y su actividad en el suelo.

## **B. LA FERTILIZACIÓN**

### **1. Generalidades**

La fertilización busca principalmente aumentar la producción agrícola, e igual objetivo tienen otras técnicas agronómicas. Es muy importante recordar que los fertilizantes contribuyen, en promedio, en un 50% del aumento de la producción (Gómez, 1996).

La gran mayoría de los fertilizantes minerales no dejan residuos tóxicos, ni en el suelo ni en la planta, como sucede en el caso de los plaguicidas. Los fertilizantes pueden ejercer algún daño en semillas, raicillas y población microbiana, debido a efectos secundarios de acidez, alcalinidad o salinidad, pero son efectos localizados (Pineda, 1996)

### **2. Importancia del nitrógeno para las plantas**

El nitrógeno es importante porque actúa en forma específica en procesos metabólicos en las plantas, y en forma estructural. En las plantas existen formas nitrogenadas además de los aminoácidos y proteínas en las que se

incluyen: vitaminas, hormonas, pigmentos, purinas y pirimidinas. Es además componente esencial de la clorofila (Kass, 1998).

El nitrógeno estimula el crecimiento vegetativo, incrementa la masa protoplasmática y aumenta la succulencia foliar. Cuando el aporte de nitrógeno es insuficiente, las plantas se observan raquílicas, delgadas y mal desarrolladas. El crecimiento es lento y hay clorosis generalizada. Si la deficiencia es severa, las hojas adquieren un color pardo oscuro y mueren (Kass, 1998).

### **3. Incorporación del nitrógeno en las plantas**

La asimilación del nitrógeno requiere una serie compleja de reacciones bioquímicas con un alto costo energético. En la asimilación del nitrato ( $\text{NO}_3^-$ ), el nitrógeno de este compuesto es convertido en una forma de energía superior, nitrito ( $\text{NO}_2^-$ ), luego en una mayor forma de energía, amonio ( $\text{NH}_4^+$ ) y finalmente en nitrógeno amídico en la glutamina. Este proceso consume 12 equivalentes de ATP por molécula de nitrógeno (Pereyra, 2001).

El transporte de  $\text{NO}_3^-$  al citoplasma a través del plasmalema es un proceso termodinámicamente desfavorable, tanto en términos de gradiente de potencial eléctrico y un gradiente de potencial químico. Lo último está basado en estimaciones de la concentración citoplasmática de  $\text{NO}_3^-$  las que varían entre 5-30 mM, mientras que los valores de concentración del suelo varían entre 0.1 y 1.0 mM (Henriksen and Spanswick, 1993).

Las plantas asimilan la mayor parte del nitrato absorbido por sus raíces en compuestos orgánicos nitrogenados. La primera etapa de este proceso es la reducción de nitrato a nitrito en el citoplasma. Dado que el nitrito formado es altamente reactivo, siendo un ión potencialmente tóxico, las células vegetales lo transportan inmediatamente después de ser generado a los cloroplastos en las hojas y a los plastidios en las raíces (Pereyra, 2001).

#### **4. Efecto de la fertilización nitrogenada sobre la nutrición humana**

El nitrógeno se presenta en forma de nitratos solubles, y el excesivo uso (buscando el desarrollo “en peso” de la planta) determina la presencia de residuos en los vegetales (por ejemplo, en hortalizas de hoja se pueden encontrar grandes cantidades de nitratos de efectos cancerígenos).

La presencia en el terreno y en las plantas de cantidades desequilibradas de nitrógeno y fósforo altera además todos los procesos bioquímicos esenciales de las plantas, con reducción de las sustancias nutritivas nobles (aminoácidos esenciales, vitaminas, hierro y otros oligoelementos útiles como el magnesio, cuya escasez en el organismo puede predisponer a varias enfermedades como las alergias). Esta aproximación significativa se manifiesta también en las técnicas de laboreo y en el modo en que se afronta la defensa de los parásitos (insectos y hongos) y de la flora adventicia.

Las fertilizaciones desequilibradas (por las dosis intensivas y la calidad de los elementos fertilizantes) y la forma en que los abonos se suministran al suelo, como sales solubles y no bajo forma orgánica, alteran profundamente la bioquímica de la planta (Ruiz, 1988).

Los abonos químicos alteran además la composición de los alimentos, por ejemplo: los abonos nitrogenados causan varios efectos negativos, entre los cuales se puede citar:

- a. El aumento del contenido de proteínas existe, pero va acompañado de una clara disminución de su valor biológico, es decir, del contenido de aminoácidos esenciales.
- b. Aumento en el contenido de nitratos
- c. Disminución en el contenido de oligoelementos como consecuencia del sistema de abonado que descuida el aporte de estas sustancias o por el antagonismo del nitrógeno y los microelementos. La forma bajo la que se suministra el nitrógeno tiene, por tanto, importancia decisiva.

- d. Disminuye el porcentaje de materia seca obteniéndose vegetales más acuosos.
- e. Disminuye la capacidad de conservación y la resistencia a los parásitos (Ruiz, 1988).

## **C. CICLO DEL NITRÓGENO**

### **1. Generalidades de los ciclos biogeoquímicos**

El ciclo de los nutrientes inorgánicos involucra a varios organismos, además entran a la atmósfera, agua e inclusive a las rocas. Así, estos ciclos químicos pasan también por los biológicos y los geológicos, por lo cual se los denomina ciclos biogeoquímicos (González y Raciman, 2000).

Cada compuesto químico tiene su propio y único ciclo, pero todos los ciclos tienen características en común:

1. Reservorios: son aquellas partes del ciclo donde el compuesto químico se encuentra en grandes cantidades por largos períodos de tiempo.
2. Fondos de recambio: son aquellas partes del ciclo donde el compuesto químico es mantenido por cortos períodos. Este período de tiempo se denomina tiempo de residencia (González y Raciman, 2000).

### **2. Ciclo del Nitrógeno**

Este es posiblemente uno de los ciclos más complicados, ya que el N se encuentra en varias formas y porque los organismos son los responsables de las interconversiones. (Ver anexo 2)

El principal reservorio de nitrógeno es la atmósfera, con 78%. Este nitrógeno gaseoso está compuesto de dos átomos de nitrógeno unidos, el  $N_2$  es un gas inerte, y se necesita una gran cantidad de energía para romper esta unión y combinarlo con otros elementos como el carbono y el oxígeno. Esta ruptura

puede hacerse por dos mecanismos: las descargas eléctricas y la fijación fotoquímica, que proveen suficiente energía para romper la unión del nitrógeno y unirse a tres átomos de Oxígeno para formar nitratos ( $\text{NO}_3^-$ ). Este procedimiento es reproducido en las plantas productoras de fertilizantes (González y Raciman, 2000).

La segunda forma de fijación del nitrógeno es llevada a cabo por bacterias quienes usan enzimas especiales en lugar de la luz solar o las descargas eléctricas. Entre estas bacterias se encuentran las que pueden vivir libres en el suelo, aquellas en simbiosis con raíces de ciertas plantas (Fabáceas) y las cianobacterias fotosintéticas (las antiguas "algas verde-azuladas") que viven libres en el agua. Las tres fijan N, tanto como nitratos ( $\text{NO}_3^-$ ) o como amonio ( $\text{NH}_4$ ). Las plantas toman los nitratos y los convierten en aminoácidos, los cuales pasan a los animales que las consumen. Cuando las plantas y animales mueren (o liberan sus desechos) el nitrógeno retorna al suelo. La forma más común en que el nitrógeno regresa al suelo es como amonio. El amonio es tóxico, pero afortunadamente, existen bacterias nitrificantes (*Nitrosomonas* y *Nitrosococcus*) que oxidan el amonio a nitritos, con dos oxígenos. Otro tipo de bacteria (*Nitrobacter*) continúa la oxidación del nitrito ( $\text{NO}_2^-$ ) a nitrato ( $\text{NO}_3^-$ ) el cual es absorbido por las plantas que completan el ciclo (González y Raciman, 2000).

Existe un tercer grupo de bacterias desnitrificantes (entre ellas *Pseudomonas desnitrificans*) que convierten nitritos y nitratos en nitrógeno gaseoso (González y Raciman, 2000).

### **3. Fijación de Nitrógeno**

Es necesario apuntar que la fijación de nitrógeno es un proceso que consume mucha energía, y que los fijadores simbióticos de nitrógeno obtienen esta energía del cultivo al que están asociados, lo que en un principio provoca algunas pérdidas en la producción vegetal. Además parece que los organismos no simbióticos pueden funcionar eficazmente a temperaturas altas

del suelo, pero (salvo el *Azotobacter spp*) no son eficaces en condiciones templadas (FAO, 1996).

Muchos suelos, en especial los suelos ácidos, no poseen poblaciones activas de estas bacterias y se ha determinado ampliamente que la inoculación bacteriana puede aumentar los rendimientos (FAO, 1996).

Los microorganismos que se asocian con las leguminosas para la fijación del nitrógeno atmosférico son bacterias del género *Rhizobium*. A medida que se ampliaron los estudios sobre la fijación de nitrógeno, se descubrió que existen plantas no leguminosas que también se pueden asociar con microorganismos fijadores como las plantas de los géneros *Alnus*, *Casuarina*, *Ceanothus*, *Cercocarpus*, *Comptonia*, *Coriaria*, *Discordia*, *Eleagnus*, *Hippophae*, *Myrica*, *Purschia*, *Shepherdia*, *Ceretozamia*, *Cycas*, *Encephalartus*, *Macrosamia*, *Podocarpus*, y *Stangeria*. También ocurre fijación no simbiótica, que es llevada a cabo por bacterias (Ver anexo 2) y algas de los géneros *Anabaena*, *Colothrix*, *Fisherella*, *Nostoc*, *Analbaepnosis*, *Chlorogloea*, *Cylindrospermum*, *Hapalosiphon*, *Mastigocladus*, *Scytonema*, *Tolypothrix* y *Westiellopsis* (Gómez, 1996). Se hacen estudios de los microorganismos del suelo, puesto que son los responsables de la mayor parte de la actividad que allí tiene lugar. Sin ellos, el suelo sería un medio estéril e inerte, sirviendo tan solo como cimiento para la construcción (Coyne, 2000).

Las bacterias fijadoras de nitrógeno pueden asociarse a raíces como por ejemplo: una asociación entre la gramínea tropical *Paspalum notatum* y una especie de *Azotobacter*, en la cual el microorganismo vive en la rizosfera de la planta protegido por un mucílago y proporcionando una fijación de unos 20 kilogramos de nitrógeno por hectárea y año (Pérez y Torralba, 1997).

También podemos encontrar asociaciones importantes entre bacterias del género *Azospirillum* y varias gramíneas. Estas bacterias tienen un amplio rango de hospederos, entre los que se encuentran el maíz y el sorgo, por lo que se ha sugerido su utilización en agricultura (Ver anexo 3). Se ha observado igualmente que las gramíneas de metabolismo C4 tropicales inducen una

mayor fijación (Pérez y Torralba, 1997). Otras asociaciones de este tipo se dan entre el arroz y bacterias del género *Klebsiella*, la caña de azúcar y *Beijerinckia* y entre algunas plantas acuáticas y *Campylobacter*.

Pero también se pueden asociar en la superficie de las hojas, ya que es un buen hábitat para desarrollarse. *Azotobacter*, *Beijerinckia* y *Klebsiella* proliferan en las hojas de plantas tropicales como el algodón, el café y las gramíneas, para satisfacción de los agricultores. Sin embargo, la aportación de nitrógeno en este caso es escasa, apenas 1 kilogramo por hectárea al año (Pérez y Torralba, 1997).

En el proceso de fijación el  $N_2$  se reduce a amoníaco, que es convertido a forma orgánica. El proceso de reducción está catalizado por el complejo enzimático nitrogenasa, que consta de dos proteínas distintas llamadas dinitrogenasa y reductasa de la dinitrogenasa. Ambos componentes contienen hierro y la dinitrogenasa también contiene molibdeno. En la dinitrogenasa el hierro y el molibdeno forman parte de un cofactor conocido como FeMo-co, que es el centro donde ocurre la reducción real del nitrógeno. La composición del FeMo-co es  $MoFe_7S_9$  homocitrato, y se presentan dos copias de FeMo-co por molécula de nitrogenasa (Madigan, Martinko & Parker; 1999). Bajo ciertas condiciones de crecimiento, algunas bacterias fijadoras de nitrógeno pueden sintetizar nitrogenasas sin molibdeno; estas nitrogenasas alternativas sin molibdeno contienen vanadio (más hierro) o hierro solo (Madigan, Martinko & Parker; 1999).

Debido a la estabilidad del triple enlace N-N, el  $N_2$  es muy inerte y su activación es un proceso que requiere mucha energía. Se debe transferir seis electrones para reducir el  $N_2$  a  $NH_3$ . El proceso se inhibe por oxígeno porque las nitrogenasas se inactivan rápida e irreversiblemente. La nitrogenasa en bacterias aerobias se protege mediante una rápida eliminación del  $O_2$  por respiración, por la producción de capas mucosas que retienen  $O_2$  o por compartimentalización de la nitrogenasa en un tipo especial de célula (los heterocistos). En *Azotobacter*, la nitrogenasa se protege de la inactivación por oxígeno mediante la formación de complejos con una proteína específica; esto

se conoce como protección conformacional (Madigan, Martinko & Parker; 1999).

La secuencia de transferencia de electrones en la nitrogenasa es como sigue: donador de electrones, reductasa de la nitrogenasa, dinitrogenasa,  $N_2$  a  $2NH_3$ . Los electrones para la reducción del nitrógeno se transfieren a la reductasa de la nitrogenasa desde la ferredoxina o la flavodoxina, proteínas de bajo potencial que contienen hierro y azufre. El requerimiento de ATP es muy alto con 4-5 ATP hidrolizados por cada dos electrones transferidos. La dinitrogenasa reducida reduce a continuación el  $N_2$  a  $NH_3$ , y la reducción real ocurre en el centro FeMo-co (Madigan, Martinko & Parker; 1999), este proceso se puede observar en la figura 1.

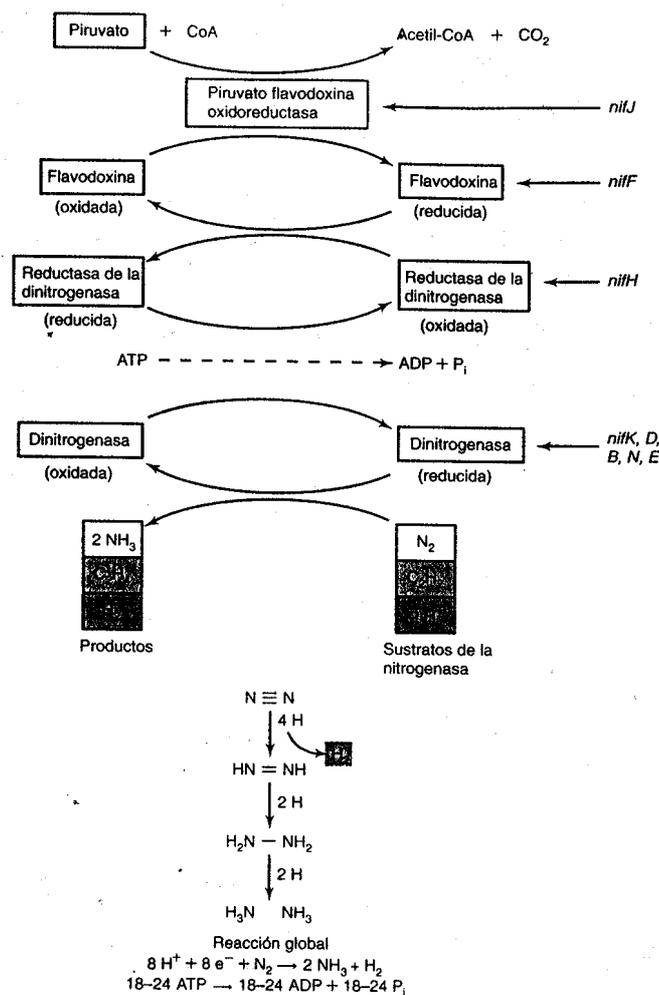


Figura 1. Etapas en la fijación de nitrógeno: reducción de  $N_2$  a  $2NH_3$ .

Los genes de la dinitrogenasa y de la reductasa de la dinitrogenasa son parte de un complejo regulón (un gran sistema de operones) llamado el regulón nif. En el regulón nif están presentes, además de los genes estructurales, los genes para FeMo-co que controlan las proteínas del transporte de electrones y varios genes reguladores (Madigan, Martinko & Parker; 1999).

La fijación de nitrógeno se bloquea por O<sub>2</sub> y por nitrógeno fijado, incluyendo NH<sub>3</sub>, NO<sub>3</sub><sup>-</sup> y algunos aminoácidos. La mayor parte de la regulación es a nivel transcripcional. Mientras que la transcripción de los genes estructurales nif se activa por la proteína NifA (regulación positiva), esta activación se elimina por la proteína NifL bajo ciertas condiciones (Madigan, Martinko & Parker; 1999).

El amoníaco producido por la nitrogenasa no reprime la síntesis de la enzima porque tan pronto como se forma se incorpora a forma orgánica y se usa en biosíntesis. Sin embargo, cuando el amoníaco está en exceso, la síntesis de nitrogenasa se reprime rápidamente. Esto evita desperdiciar ATP haciendo un producto que ya está en alta cantidad. En algunas bacterias, el amoníaco da un efecto conmutador, en este caso el exceso origina una modificación covalente de la reductasa de dinitrogenasa que produce una pérdida de actividad enzimática, pero es un proceso reversible (Madigan, Martinko & Parker; 1999).

#### **4. Nitrificación**

En este proceso, el amonio (NH<sub>4</sub><sup>+</sup>) se transforma primero en nitrito (NO<sub>2</sub><sup>-</sup>), y éste en nitrato (NO<sub>3</sub><sup>-</sup>) mediante la acción de las bacterias aerobias del suelo.

El proceso se lleva a cabo en dos etapas coordinadas, controlada cada una por diferentes grupos de bacterias. Globalmente se las llama nitrobacterias. Al grupo responsable de la conversión de compuestos amoniacaes en nitritos se les llama Nitrosomonas. El grupo encargado de la oxidación de los nitritos a nitratos recibe el nombre de Nitrobacter. El esquema de las transformaciones es el que sigue:





Debido a que normalmente el nitrito se transforma en nitrato con mayor rapidez que se produce, los niveles de nitrito en los suelos suelen ser muy bajos en comparación con los de nitrato.

Bajo condiciones adecuadas, la nitrificación puede transformar del orden de 10-70 kilogramos de nitrógeno por hectárea por día. Esto implica que un abonado en forma amónica puede transformarse casi totalmente en nitrato en unos pocos días si la humedad y temperatura del suelo son favorables. En ocasiones, debido a que la nitrificación es más rápida que la mineralización, se emplea el término mineralización para indicar el proceso global de conversión del nitrógeno orgánico en nitrógeno mineral (fundamentalmente nitrato y amonio).

## **5. Inmovilización**

La mineralización es la transformación del nitrógeno orgánico en amonio ( $\text{NH}_4^+$ ) mediante la acción de los microorganismos del suelo. La inmovilización es el proceso contrario. Como ambos actúan en sentido opuesto, su balance se denomina mineralización neta. La mineralización neta de la materia orgánica del suelo depende de muchos factores, tales como el contenido en materia orgánica, la humedad y la temperatura del suelo. En climas templados la mineralización neta anual es, aproximadamente, el 1-2% del nitrógeno total, y esto supone una producción de nitrógeno mineral de unos 40 a 150 kg/ha, en los primeros 30 cm del suelo.

## **6. Desnitrificación**

La desnitrificación es la conversión del nitrato en nitrógeno gaseoso ( $\text{N}_2$ ) o en óxidos de nitrógeno, también gaseosos, que pasan a la atmósfera. Este fenómeno se debe a que, en condiciones de mucha humedad en el suelo, la falta de oxígeno obliga a ciertos microorganismos a emplear nitrato en vez de oxígeno en su respiración.

## D. BACTERIAS FIJADORAS DE NITRÓGENO

### 1. *Azotobacter spp*

Las bacterias *Azotobacter spp* son bacilos grandes que pueden poseer un diámetro de 2-4  $\mu\text{m}$ . Son bacterias Gram negativas y aerobias estrictas. Algunas cepas presentan motilidad por flagelos peritricos. En medios con carbohidratos las bacterias de vida libre forman cápsulas formadas de gruesas capas de mucílago (Madigan, Martinko & Parker; 1999).

Las bacterias del género *Azotobacter* crecen bien en medios de cultivo que contengan como fuente de carbono: manitol, glucosa, sacarosa o ácidos orgánicos (Rao, 1984).

El *Azotobacter vinelandii* contienen pigmentos verde fluorescente cuya producción es incrementada en un medio limitado de hierro y el cual se ha identificado como hecho de 2 componentes fenólicos. En el caso de *A. chroococcum* se producen pigmentos verde oscuro (Rao, 1984).

El *Azotobacter spp* presenta formas resistentes llamados cistes y son diferenciados en presencia de algunas fuentes de carbono como el butanol y el  $\beta$ -hydroxybutyrato (Rao, 1984). Estos cistes presentan una respiración endógena mínima y resisten la desecación, la desintegración mecánica y las radiaciones ultravioleta e ionizantes. No obstante, no son resistentes al calor y oxidan rápidamente las fuentes de energía exógena (Madigan, Martinko & Parker; 1999).

La especie *A. chroococcum* fue la primera que demostró que podía crecer a partir de nitrógeno atmosférico en ausencia total de molibdeno pero en presencia de vanadio. Sin embargo las tasas de reducción del sustrato son considerablemente menores (Madigan, Martinko & Parker; 1999).

## 2. *Azospirillum spp*

Esta especie fue descubierta en 1922 por Beijerinck y se le llamó inicialmente *Spirillum lipoferum* (Rao, 1984). Estas bacterias son bacilos ligeramente curvados a menudo con puntos en los extremos, Gram negativos, presentan motilidad, es microaerófila, y su diámetro celular es de 1  $\mu\text{m}$ , el pH del medio debe estar entre 6.8 y 7.8 (Madigan, Martinko & Parker; 1999; Krieg & Döbereiner, 1984).

Se ha descubierto que establece una relación simbiótica laxa con plantas herbáceas tropicales y con cereales cultivados. También puede ser de vida libre o asociado con plantas tuberosas (Madigan, Martinko & Parker; 1999; Krieg & Döbereiner, 1984).

El caldo nutritivo es un medio muy completo, sin embargo, *Azospirillum lipoferum* crece en presencia de varios azúcares incluyendo glucosa así como ácidos orgánicos y requiere biotina. En el caso de *A. brasilense* no crece en glucosa ni otros azúcares, pero utilizan ácidos orgánicos como el malato (Rao, 1984).

La mayoría son desnitrificantes (liberan  $\text{N}_2$  a la atmósfera) en condiciones anaeróbicas. La fijación ocurre en estadíos tempranos del crecimiento por un período corto de tiempo antes de la asimilación del amonio resultando en la reducción a nitrato (Rao, 1984). Todas las especies reducen el nitrato a nitrito en condiciones aeróbicas (Krieg & Döbereiner, 1984).

*Azospirillum lipoferum* es capaz de acidificar un medio con glucosa o fructosa en condiciones anaeróbicas. La glucosa es utilizada por todas las especies de *A. lipoferum* y por unas pocas de *A. brasilense*, sin embargo, ésta última no puede utilizar la glucosa como única fuente de carbono en crecimiento dependiente de  $\text{N}_2$  (Krieg & Döbereiner, 1984).

Las pruebas diagnósticas positivas para estas especies son: oxidasa, fosfatasa, ureasa, hidrólisis de esculina, habilidad de crecer anaeróbicamente en un medio base peptona nitrato, y la habilidad de disimilar nitrato (Krieg & Döbereiner, 1984).

## **E. AGRICULTURA ORGÁNICA**

### **Biofertilizantes**

Los biofertilizantes son aquellos en el que su componente activo son organismos vivos. Algunas de las ventajas comprobadas del uso de estas bacterias (*Azospirillum spp* y *Azotobacter spp*) como biofertilizante son:

- Producen reguladores del crecimiento, como el ácido indolacético (AIA) y las citocininas, capaces de acelerar y potenciar el crecimiento de las plantas.
- Al permanecer vivas durante años y reproducirse en el suelo, no sólo no lo degradan sino que contribuyen a su enriquecimiento en nitrógeno y a su regeneración de forma ecológica y gradual, incluso en terrenos de alta concentración salina.
- Se ha comprobado que fertilizando los cultivos con estas bacterias y con nitrógeno químico en un porcentaje entre el 20 y 50% del utilizado normalmente, se consigue un aumento de producción sobre las cosechas obtenidas únicamente con fertilizante químico al 100%. Esto es debido a que, al liberarse la bacteria de su función fijadora de nitrógeno, produce más factores de crecimiento vegetal.
- Crea una barrera protectora contra hongos y bacterias patógenas en la raíz de la planta, por lo que ésta crece más sana y fortalecida.
- Producen enzimas que solubilizan los fosfatos y los hacen más accesibles a la planta, así como factores que facilitan la absorción de oligoelementos.
- Se ha demostrado que resisten mejor las condiciones de sequía y los climas áridos ya que se forman alginatos en las raíces de las plantas.

- Como consecuencia de todo lo anterior, pueden favorecer un mayor desarrollo de las raíces de las plantas, con el consiguiente beneficio general para ésta, así como el peso de los frutos.
- También se ha comprobado un mayor índice de germinación de semillas comparada con otros sistemas de abonado.
- Las nuevas cepas de *Azotobacter sp* y *Azospirillum sp* son capaces de fijar un 72,64% más de nitrógeno atmosférico, que las estirpes originales.

Existen dos problemas a resolver:

- Una población microbiana abundante compite por nutrientes con las plantas. Un ejemplo de esto es la inmovilización del nitrógeno cuando se incorpora al suelo material vegetal con relación C/N alta. Esto indica que no se puede sobrepasar ciertos niveles de población y, por consiguiente, de actividad microbiana (Gómez, 1996).
- Los microorganismos proliferan muy bien y tienen una alta actividad en los suelos fértiles; o sea en aquellos con un buen abastecimiento de nutrientes (Gómez, 1996).

## **MATERIALES Y MÉTODOS**

### **a. Evaluación y selección de las cepas**

1. Se tomaron las cepas proporcionadas por el Laboratorio de Microbiología Agrícola del Centro de Investigaciones Agronómicas de la Universidad de Costa Rica y se rayaron en placas de petri con agar nutritivo y agar NFb. Las cepas se incubaron 48 horas a 35°C. Unas placas se guardaron como reserva a 4°C y las demás se utilizaron como cepas de trabajo (Ver anexo 5).
2. Se inoculó cada cepa (nombradas como AI-1, AI-2, AI-3 y AI-4) en caldo nutritivo, y se incubó por 48 horas a temperatura ambiente en agitación constante en un agitador orbital.
3. Después del tiempo de incubación se hizo un recuento bacteriano y se midió la transmitancia (Ver anexo 6), según los resultados se escogió una cepa.

### **b. Desarrollo del biofertilizante**

#### **b.1. Pruebas en caldo nutritivo y medio libre de nitrógeno (NFb)**

4. A la cepa AI-3, se le inoculó en un caldo NFb, suplementado con concentraciones crecientes de glucosa (0%, 1%, 2% y 3%), y se incubó a temperatura ambiente en un agitador orbital. Se evaluaron las células bacterianas mediante una tinción de Gram a los 2 y 4 días.
5. Se inoculó el caldo nutritivo con AI-3 y se incubó a temperatura ambiente durante dos días en agitación. Al final de este período se centrifugaron las bacterias en una centrífuga para tubos de 50 ml de capacidad. Se probaron con tiempos de 10, 20 y 25 minutos a 4000 rpm con el tubo lleno utilizando 50ml del cultivo.

6. Después de centrifugar se eliminó el sobrenadante y el botón se resuspendió en 30 ml un buffer fosfato. A esta resuspensión se le hizo un recuento bacteriano para determinar las UFC/ml.

## **b.2. Prueba de un método de producción del biofertilizante**

7. Se inoculó un caldo nutritivo con Al-3 y se incubó a temperatura ambiente por dos días. Al final de este período se centrifugaron las bacterias tomando 50 ml del inóculo en cada tubo (Centrífuga con capacidad para 6 tubos) y se centrifugaron por 25 minutos a 4000 rpm. El botón se resuspendió en NFb líquido con glucosa al 2% (50 ml de inóculo de caldo nutritivo centrifugado para 50 ml de NFb líquido). Los cultivos se incubaron a temperatura ambiente en agitación constante por dos días o cinco días.
8. Utilizando el inóculo obtenido a partir de caldo nutritivo resuspendido en buffer fosfato (Ver anexo 7) se inocularon 100 gramos del sustrato (compostaje + peat moss), y se hizo un recuento al momento de inocular y dos días después.
9. A los dos días de crecimiento de Al-3 en NFb líquido con 2% de glucosa se evaluó mediante una tinción de Gram y un recuento bacteriano. El inóculo se centrifugó y resuspendió en buffer, luego se mezcló con 100 gramos de sustrato y se hizo un recuento al momento de inocular y a los 8 días de inoculado.
10. Se guardó una muestra de este cultivo en suspensión de buffer a 4°C y se evaluó cinco días después haciendo una tinción de Gram y un recuento.
11. En todos estos recuentos, adicionalmente se inoculó NFb sólido con la muestra más diluida, para identificar fácilmente a *A. lipoferum*. Se incubó a 35°C de dos a tres días.

### c. Pruebas al sustrato

12. Se midió el pH, tomando partes iguales de sustrato y agua deionizada y se midió con un pHmetro (Para detalles ver anexo 8).

13. Además se le realizó un recuento bacteriano.

14. Adicionalmente se realizó una prueba de germinación, tomando compostaje y peat moss en proporciones de 0 (solo peat moss), 25%, 50%, 75% y 100% de compostaje. Se colocaron las muestras en placas de petri (tres repeticiones por muestra), y se sembraron 10 granos de arroz en cada placa. Se dejaron a temperatura ambiente y oscuridad.

### d. Ensayo en el Invernadero

15. Se probaron dos sustratos: a. Compostaje de caña con peat moss (S1), b. Compostaje de caña con peat moss más una parte de suelo de bosque (S2). Se realizaron cuatro tratamientos: a. Sustratos solos (T1), b. Sustratos más Osmocote (T2), c. Sustratos más el biofertilizante a base de *Azospirillum lipoferum* (T3), d. Sustratos más Fertibiol (T4).

**Cuadro 1.** Características del fertilizante químico Osmocote y del biofertilizante Fertibiol.

Fertilizante	Características
Osmocote	Fertilizante de liberación controlada, con nitrógeno, fósforo y potasio (NPK)
Fertibiol	Biofertilizante y biocontrolador compuesto por cepas de <i>Azotobacter sp</i> , <i>Pseudomonas sp</i> , <i>Bacillus sp</i> y micorrizas.

16. Al suelo utilizado en el sustrato, se trató previamente con bicarbonato de sodio (2g/L). Se empapó el suelo con esta disolución, se colocó en bolsas cerradas y se dejó dos días.

17.El sustrato con suelo se preparó adicionando una parte de sustrato de compostaje con peat moss, con una parte de suelo tratado.

18.Cada sustrato con su tratamiento se mezcló bien en un balde y se llenaron las bandejas como se muestra en la figura 2.

X	X	X	X	X	X	X			X	X	X	X	X	X	X
X	X	X	X	X	X	X			X	X	X	X	X	X	X
X	X	X	X	X	X	X			X	X	X	X	X	X	X
X	X	X	X	X	X	X			X	X	X	X	X	X	X
X	X	X	X	X	X	X			X	X	X	X	X	X	X
X	X	X	X	X	X	X			X	X	X	X	X	X	X
X	X	X	X	X	X	X			X	X	X	X	X	X	X

**Figura 2.** Distribución de la siembra en la bandeja de 128 huecos. **X** representa los espacios sembrados y la zona sombreada son las plántulas que se pueden evaluar

19.Se tomaron 3 muestras de cada sustrato tratado y se realizó un recuento a cada muestra.

20. La especie que se utilizó fue tomate (*Licopersicom esculentum*) DRD 8108 y se realizaron tres repeticiones de cada tratamiento. Se colocaron las bandejas en el cuarto de germinación por 4 días.

21.Al final de este período se colocaron las bandejas sobre la cama haciendo una sola fila. La distribución de las parcelas experimentales y las repeticiones se pueden consultar en el anexo 9.

22.Además se hizo una segunda inoculación de *A. lipoferum* utilizando 100 ml de biofertilizante ajustado a  $10^7$  UFC/ml por parcela experimental del tratamiento 3.

**23.** Cada tratamiento fue marcado de la siguiente forma: **S1T1**, Compostaje + Peat moss; **S1T2**, Compostaje + Peat moss + Osmocote; **S1T3**, Compostaje + Peat moss + Biofertilizante a base de *A. lipoferum*; **S1T4**, Compostaje + Peat moss + Fertibiol; **S2T1**, Compostaje + Peat moss + Suelo; **S2T2**, Compostaje + Peat moss + Suelo + Osmocote; **S2T3**, Compostaje + Peat moss + Suelo + Biofertilizante a base de *A. lipoferum*; **S2T4**, Compostaje + Peat moss + Suelo + Fertibiol.

**24.** Las evaluaciones se realizaron a los 7, 11, 14, 18, 21 y 25 días de la siembra, tomando datos del crecimiento longitudinal hasta el ápice en centímetros, % de germinación por días, ancho y/o largo de hoja.

**25.** En el día 30 se tomaron 10 plantas al azar de cada repetición y se les midió la longitud aproximada de la parte aérea con las hojas estiradas y de las raíces. Además se observaron sus características físicas. Se segmentaron las plantas, separando la raíz del resto de la planta, y se pesaron. Ambas partes se pusieron a secar envueltas en papel toalla a temperatura ambiente por 15 días, al final de los cuales se pesaron nuevamente.

#### **e. Comprobación de la infección de la raíz**

##### **e.1. Tratamiento con *Azospirillum lipoferum***

**26.** Se tomaron 3 plantas al azar de cada repetición de los tratamientos con *A. lipoferum* y se procedió a verificar si hubo infección en la raíz.

**27.** Se lavaron las raíces con agua del tubo y un cepillo cuidando de no maltratarlas.

**28.** Se llevaron a la cámara de flujo laminar y se cortaron en segmentos de 2 a 3 cm de largo, procurando tomar la raíz principal y varias secundarias.

**29.** Se les agregó NaOCl al 2% (v/v) por 5 minutos y luego se hicieron tres lavados con agua deionizada estéril.

**30.** Con ayuda de pinzas estériles, se colocaron las raíces verticalmente en medio NFb semisólido dejando las raíces a 0.5 cm de profundidad, se sembraron la raíz principal y dos secundarias de cada planta muestreada.

**31.** Se colocaron los tubos con las raíces en la incubadora a 35°C por 24 a 72 horas.

**32.** Además se muestrearon tres plantas de cada repetición de los tratamientos con Fertibiol y se procedió a verificar si hubo infección en la raíz.

#### **e.2. Tratamiento con Fertibiol**

**33.** Se lavaron las raíces con agua de cañería y en la cámara de flujo laminar, se cortaron en trozos muy pequeños de 1-2 mm de longitud.

**34.** Se pesó un gramo de raíz de cada repetición y se colocó en tubo con 9 ml de agua deionizada estéril. Se agitaron por media hora en el vortex.

**35.** Se hicieron diluciones hasta  $10^{-5}$ . Se tomaron 0.1 ml de cada dilución y se colocaron en agar nutritivo y agar papa dextrosa acidificado

**36.** Se pusieron a crecer en incubadora a 35°C por 48 horas. Luego se identificaron las bacterias y hongos componentes del Fertibiol.

## RESULTADOS

### a. Evaluación de las cepas

Como paso inicial se evaluaron las cepas de *Azospirillum lipoferum* mediante la inoculación en caldo nutritivo para observar su crecimiento. Luego se evaluaron mediante un recuento bacteriano y se obtuvo que de las cuatro cepas la número tres presentó los recuentos más altos (Cuadro 2).

**Cuadro 2.** Resultados obtenidos en los recuentos y transmitancia de cada cepa en caldo nutritivo dos días a temperatura ambiente en agitación constante.

Cepa	Conteo	UFC /ml	% Transmitancia a 450 nm
AI-1	149 x 10 <sup>6</sup>	1.5 x 10 <sup>8</sup>	71
AI-2	139 x 10 <sup>6</sup>	1.4 x 10 <sup>8</sup>	55
AI-3	578 x 10 <sup>6</sup>	5.8 x 10 <sup>8</sup>	46
AI-4	264 x 10 <sup>6</sup>	2.6 x 10 <sup>8</sup>	41

Fuente: Datos de campo

### b. Desarrollo del biofertilizante

El crecimiento de las bacterias difiere según el medio que se utilice, en el medio NFb sólido crecen formando colonias pequeñas y duras con un punto en el centro, además las colonias tienen un aspecto rugoso. Crecen lentamente, ya que a dos días a 35°C se vieron colonias muy pequeñas, pero a los cinco días se observaron mejor.

En un medio de agar nutritivo las bacterias crecen formando colonias grandes, suaves y amarillentas, pero su crecimiento es más acelerado ya que esto se observó a los dos días a 35°C.

En caldo nutritivo, después de dos días a temperatura ambiente y en agitación constante se observó mucha turbiedad en el medio, mientras que en NFb inoculado y mantenido bajo las mismas condiciones que en el caldo no se



**Figura 3.** Tinción de Gram para *A. Lipoferum* de cepas crecidas en caldo nutritivo dos días a temperatura ambiente y en agitación constante.

observó crecimiento o es muy poco según los resultados que se observan en el cuadro 3.

**Cuadro 3.** Resultados obtenidos en la medición del crecimiento del caldo NFb con concentraciones crecientes de glucosa inoculado con *A. lipoferum*.

Concentración Glucosa (% p/v)	Transmitancia 540 nm (%)	Recuento AN (UFC/mL)
0	95	$4,0 \times 10^4$
1	97	$8.9 \times 10^4$
2	97	$7.1 \times 10^4$
3	97	$3.7 \times 10^4$

De los recuentos realizados a lo largo del proceso se observa que el crecimiento en caldo NFb es mínimo, aunque al realizarse una tinción de Gram se lograron observar cambios en la morfología de las células, formación de gránulos de PHB y agrupación de las bacterias.

Entonces se evaluó la combinación del sistema de crecimiento en caldo nutritivo y luego en NFb líquido. En el anexo 10, se observa el resultado obtenido en los recuentos que se hicieron a lo largo del crecimiento del biofertilizante bajo este sistema. En él se puede determinar que mediante este proceso se obtiene un gran número de células por mililitro y se logra inducir la formación de gránulos de PHB.

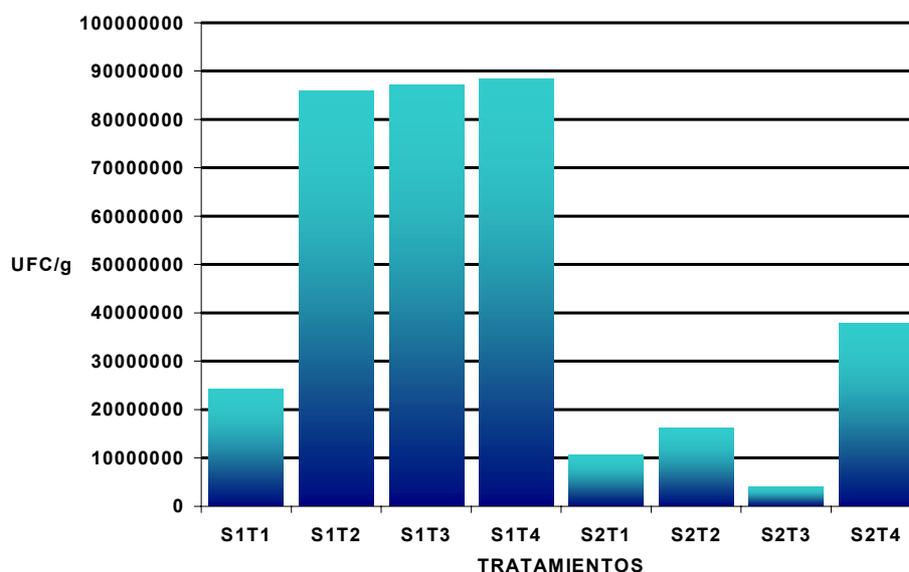
También se puede ver que la resuspensión en buffer fosfato en refrigeración a 4°C mantiene la viabilidad de las células. Además, se deduce que después de varios días después de inoculados los sustratos, la variación en la carga microbiana es mínima (Ver anexo 10).

### c. Pruebas al sustrato

Al medir el pH de la muestra de compostaje se obtuvo que esta se encuentra en 6.9 unidades de pH, mientras que la muestra del sustrato 1 fue de 6.7 unidades de pH. En el recuento bacteriano que se le hizo al sustrato, se obtuvo una concentración de  $10^7$  UFC/g y no se observaron bacterias patógenas.

### d. Ensayo en el Invernadero

Se realizaron recuentos de cada tratamiento con tres repeticiones, para obtener una visión general de la cantidad y tipo de población que se encontraban en los sustratos. En la figura 4 se muestra gráficamente como los sustratos con una parte de suelo muestran poblaciones bacterianas más bajas que los demás.



**Figura 4.** Recuentos realizados a los sustratos y tratamientos del ensayo de campo al momento de la siembra.

La emergencia de la mayoría de las plantas se empezó a observar a partir del día 7, pero la población se normalizó hasta el día 11. El promedio de germinación se fijó en un 92%. Y las diferencias en el crecimiento se hicieron notables a simple vista se empezaron a notar a partir del día 14 y a acentuarse con el paso de los días. En la figura 5 se puede observar algunas de estas diferencias, marcadas no solamente por el crecimiento longitudinal, sino también en área foliar, coloración y resistencia a la falta de agua. En las figuras 5B y 5C se observan diferencias en el crecimiento de las plantas, de izquierda a derecha se observa el control absoluto, el control químico, el tratamiento con *A. lipoferum* y el tratamiento con Fertibiol, en el sustrato sin suelo.

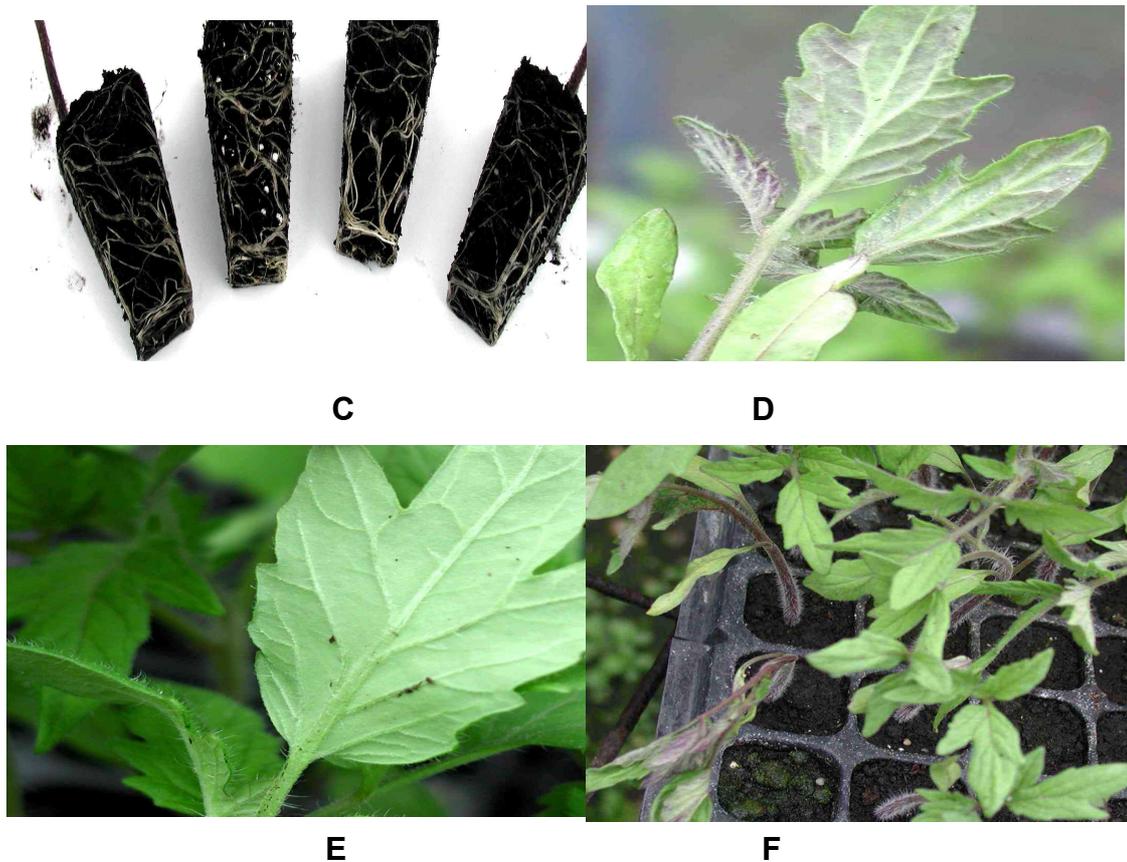
Uno de los aspectos más importantes a tomar en cuenta es que a partir del día 14 se empezó a notar deficiencia de fósforo, que era muy evidente en el control absoluto y tratamiento con *A. lipoferum*, con menor incidencia en el tratamiento con Fertibiol, y muy poco frecuente en el control químico. En la figura 5D, se observa una planta del tratamiento con *A. Lipoferum* y en la figura 5E una planta del control químico. También en la figura 5F se puede observar la marchitez que sufren las plantas ante la carencia de agua cuando se tarda más de 24 horas sin riego que mostraron las plantas del control químico.



**A**

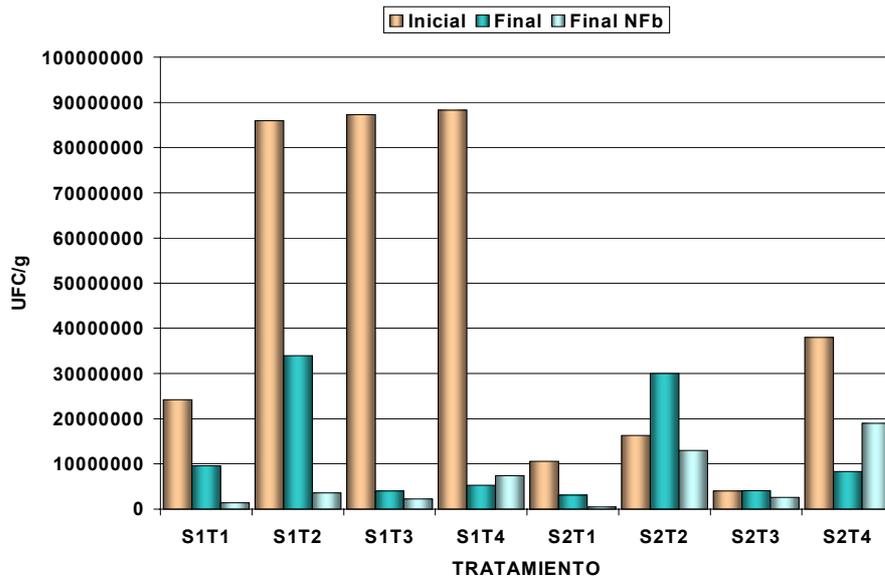


**B**



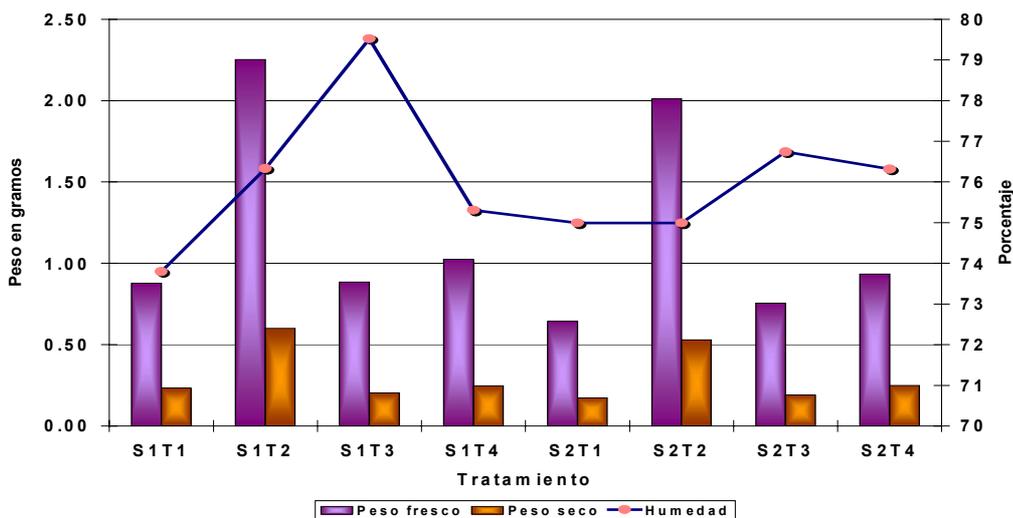
**Figura 5.** Crecimiento de las plántulas de tomate en invernadero. A, diferencias en el crecimiento de los tratamientos; B y C, diferencias en el sistema radical de los tratamientos (de izquierda a derecha, el control absoluto, el control químico, con A. Lipoferum, con Fertibiol); D, planta con deficiencia de fósforo; E, planta sana del control químico; F, marchitez de plantas del control químico ante la falta de agua.

Al finalizar el período de almácigo se realizaron nuevamente los recuentos bacterianos al sustrato, cuyos resultados se observan en la figura 6. En este se observa una clara disminución en las poblaciones bacterianas al final del ensayo del campo y también que para el tratamiento con Fertibiol es mayor la población de fijadores de nitrógeno (crecimiento en NFb) que la presentada en los demás tratamientos. Además que las poblaciones bacterianas más altas al final del período se obtuvieron en los controles químicos.



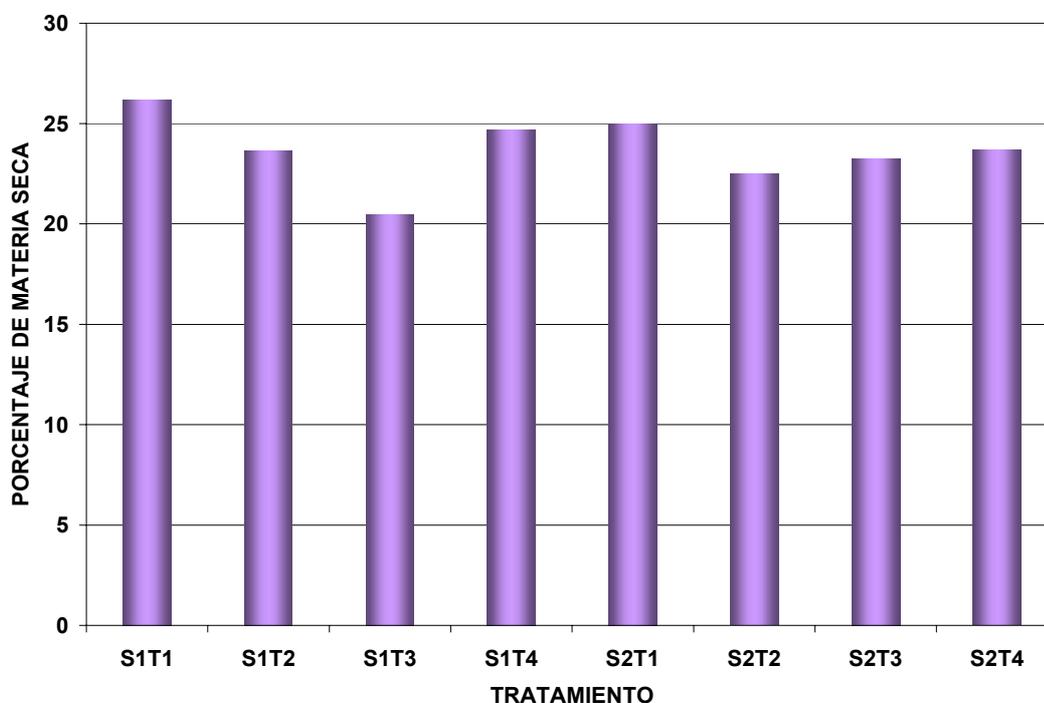
**Figura 6.** Diferencias en el recuento inicial y el final en agar nutritivo y NFB.

Otro factor que se cuantificó fue el peso fresco y seco de una muestra de 10 plantas tomadas al azar de cada repetición, para determinar el contenido de humedad como un indicador de succulencia. En este caso el tratamiento con *Azospirillum lipoferum*, fue el más alto con un porcentaje de humedad de 79.5% en el caso del sustrato sin suelo y de un 76.7% para el segundo sustrato con suelo. En la figura 7 se muestran los principales resultados en este rubro.



**Figura 7.** Resultados del contenido de humedad por tratamientos al final del ensayo en el Invernadero.

Con estos mismos datos se determinó el porcentaje de materia seca de las plantas, en la que observó que el porcentaje más bajo lo obtuvo el tratamiento con *A. lipoferum*, siendo el control absoluto el que obtuvo el porcentaje más alto seguido del tratamiento con Fertibiol, como se observa en la figura 8.



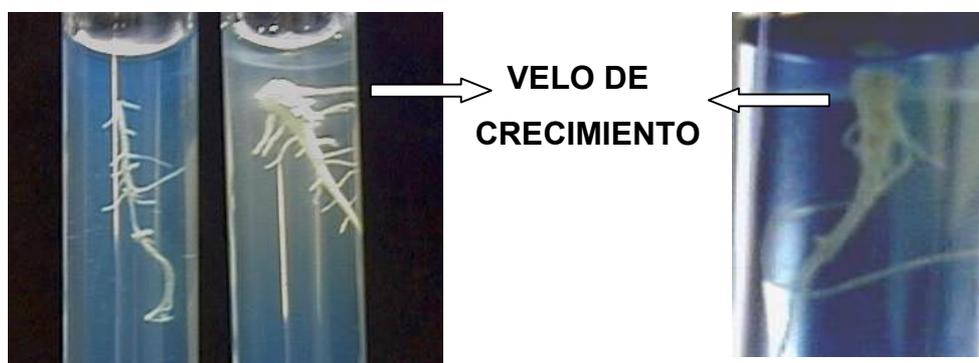
**Figura 8.** Porcentaje de materia seca de las plantas de cada tratamiento.

Se hizo un análisis cualitativo de una muestra de 10 plantas de cada tratamiento tomadas al azar y se observaron las raíces desnudas. Se encontró que las plantas de los tratamientos biológicos mostraban raíces muy blancas, fuertes y de mayor grosor que las plantas de los controles.

También se observó que las plantas de los tratamientos del sustrato con suelo, algunas mostraban síntomas del ataque de nemátodos, y al cuantificar las plantas enfermas se obtuvo que tanto el control absoluto como en el químico, 9 de cada 10 plantas estaban enfermas, pero que esta proporción se descubrió a la inversa para los tratamientos biológicos donde se encontró 1 de cada 10 plantas afectadas por esta plaga.

## 5. COMPROBACIÓN DE LA INFECCIÓN EN LA RAÍZ

Al analizar las raíces de los tratamientos con *A. lipoferum*, se encontró que el 92% de las plantas muestreadas se encontraban infectadas, al poner 2 cm de raíz principal en medio NFb semisólido. Se consideraron positivas aquellas pruebas que mostraron la formación de un velo de crecimiento bajo la superficie del medio al cabo de 48 horas. También se probó con las raíces secundarias pero sólo un 4% resultó positivo. En la figura 9, se observan tubos con el velo de crecimiento y sin él.



**Figura 9.** Velo de crecimiento en NFb semisólido, prueba para determinar si las raíces estaban infectadas con *Azospirillum lipoferum*. A la izquierda un tubo negativo para esta prueba.

Para comprobar si las raíces de las plantas tratadas con Fertibiol estaban infectadas se efectuó un recuento de raíces en PDA y AN. Al finalizar el período de incubación se identificaron las bacterias y hongos que forman parte de este producto, demostrando que estas plantas también fueron infectadas por el tratamiento. Además se encontraron colonias de *Streptomyces spp* en casi todas las repeticiones, algunas también mostraron crecimiento de *Trichoderma spp* que se contó como dentro de los componentes el Fertibiol (no es usual en este producto).

## Análisis Estadístico

Se realizó un análisis estadístico de tipo ANOVA, para determinar diferencias significativas entre repeticiones y tratamientos, para dos características cuantitativas: longitud del tallo hasta el ápice y ancho de la hoja.

En cuanto a la longitud de las plantas se encontró que si hubieron diferencias significativas entre los tratamientos ( $F_{15,356}=20.65$ ;  $p<0.000$ ). El tratamiento químico fue el mejor, y aunque no existe diferencia significativa entre el sustrato 1 y 2, el número dos (con una parte de suelo) fue superior en cuanto a promedios (Ver anexo 11). Entre los demás tratamientos, el tratamiento con Fertibiol fue superior a los controles (ver figura 5).

El tratamiento con *A. lipoferum* y los controles mostraron pocas diferencias, aunque mostraron mejores promedios cuando se utilizó una parte de suelo con el sustrato.

También se encontraron diferencias significativas entre las repeticiones donde la número dos fue la mejor, seguida de la uno.

En cuanto al ancho de la hoja se determinó que existieron diferencias significativas entre los tratamientos ( $F_{23,537}=29.57$ ;  $p<0.000$ ). El tratamiento con un fertilizante de liberación controlada fue el mejor, seguido del tratamiento con Fertibiol. Pero a diferencia de la longitud de la planta, el tratamiento con *Azospirillum lipoferum* fue mejor que los controles y muy semejante al tratamiento con Fertibiol (Ver anexo 12).

Otro aspecto a destacar es que se reportaron hojas más anchas cuando se utilizó el sustrato sin suelo, y la mejor repetición fue la dos, luego la uno y por último la tres.

## DISCUSIÓN

### 1. Evaluación de las cepas

Es importante destacar que la cepa se escogió por presentar los recuentos más altos, es decir, en la misma cantidad de tiempo y bajo las mismas condiciones fue capaz de generar la mayor cantidad de bacterias. Además en pruebas realizadas anteriormente, esta cepa fue la que mejores resultados dio a nivel de invernadero.

### 2. Desarrollo del biofertilizante

Las diferencias que se observan en el crecimiento en agar nutritivo y NFB sólido, se deben principalmente a las condiciones que ofrecen en cuanto a protección del oxígeno y la fuente de nitrógeno. Según el manual de Bergey, *Azospirillum lipoferum* en un medio malato libre de nitrógeno crece como células alargadas que eventualmente se observan de forma ovoide y con la acumulación de gránulos de PHB.

El medio de cultivo libre de nitrógeno es excelente para crecer bacterias del género de *Azospirillum*, ya que es un medio muy completo y que al mismo tiempo permite la activación de la enzima nitrogenasa debido a que las necesidades de nitrógeno de la bacteria deben ser tomadas de la fase gaseosa del envase en que se pone a crecer. Sin embargo, para que las bacterias de este género puedan crecer en este medio es necesario adicionar una fuente de energía que permita la fijación del nitrógeno, ya que este es un proceso que requiere de mucha energía. *Azospirillum lipoferum* es capaz de utilizar como única fuente de carbono la glucosa, el alfa-cetoglutarato, el malato, el succinato, piruvato, lactato y fructosa, de ahí que se probara la utilización de medio NFb en caldo enriquecido con concentraciones crecientes de glucosa.

El crecimiento de estas bacterias en caldo NFb es mínimo debido a que para que haya fijación de nitrógeno las bacterias deben estar en condiciones microaerofílicas y con una atmósfera con una mezcla de gases con oxígeno de

1-25%, para que exista un equilibrio con la respiración bacteriana. En el ambiente que brinda un erlenmeyer cerrado no hay suficiente cantidad de N<sub>2</sub>, como para llenar las necesidades de la gran cantidad de células que se obtienen en poco tiempo, por lo que se vuelve un factor limitante. Entonces surge la necesidad de incorporar la fuente de nitrógeno bajo otra forma.

Es importante destacar que las tinciones de Gram revelaron que el *Azospirillum lipoferum*, después de 5 días de incubado en NFb comienzan a acumular gran cantidad de gránulos de PHB, debido a que hay condiciones sub óptimas de crecimiento como el agotamiento de los nutrientes del medio de cultivo. Estos gránulos son importantes porque hay mayor resistencia a la desecación, a la luz ultravioleta y al choque osmótico (Caballero, 2001). También se observa que se forman grupos de células muy grandes (floculación) debido a la formación de exopolisacáridos que permite la agregación de las células y que posteriormente favorecerá la infección de la raíz.

A raíz de esto, se decidió probar el crecimiento de la cepa por dos o tres días en caldo nutritivo para obtener una densidad de población mayor que la obtenida en NFb líquido (superior al orden de 10<sup>4</sup> células por mililitro), y luego poner estas bacterias en medio libre de nitrógeno suplementado con glucosa para favorecer la acumulación de gránulos de PHB y la floculación.

Este sistema funcionó mejor porque la cepa al crecer en agar nutritivo aumentó su población rápidamente hasta 10<sup>7</sup> o 10<sup>8</sup> células por mililitro. Luego al pasarlos a NFb líquido por cinco días a 35°C, las bacterias cambiaban su morfología y formaban grandes agregados que se podían observar a simple vista.

Se presentaron varios problemas, entre los que destacan:

1. Un alto nivel de contaminación por la constante manipulación, ya que al final del período de crecimiento en agar nutritivo se centrifugaba, y luego al terminar la incubación en NFb se repetía este procedimiento como medio de separación para eliminar residuos que pudieran interferir con las bacterias y luego éstas se resuspendían en el buffer fosfato. Estos

problemas se presentaron frecuentemente a pesar de la especial atención que se le puso al trabajo cuidadoso y a la esterilización de todos los materiales.

2. El proceso se vuelve largo y tedioso cuando se trata de trabajar en grandes volúmenes, debido a que el proceso de centrifugación es lento y se requiere de mucha manipulación.

La utilización del buffer fosfato para resuspender las bacterias resultó muy efectivo, ya que mantiene las células viables hasta por dos meses, sin variar mucho la concentración de las mismas y no representa ningún contaminante para las plantas. Además al mantener el pH controlado previene problemas de regulación osmótica.

### **c. Pruebas al sustrato**

Las diferentes pruebas que se realizaron al sustrato, se hicieron con el fin de cuantificar la calidad del mismo, y ver la compatibilidad con el sistema a implementar. Así el pH del sustrato resultó óptimo para el desarrollo de *Azospirillum lipoferum*, ya que esta bacteria crece mejor en ambientes con un pH cercano a la neutralidad, como el presentado por el sustrato.

Otro factor importante a considerar es que las poblaciones naturales de bacterias y hongos del sustrato, indicaron que el sustrato era de muy buena calidad ya que se encontraba libre de patógenos.

### **d. Ensayo en el Invernadero**

En el momento en que se prepararon los sustratos para la siembra se inocularon los mismos con los tratamientos biológicos. El Fertibiol es un producto sólido por lo que debe ser agregado al sustrato cuando éste se prepara. Igualmente se inoculó con *A. lipoferum* para que se encontrara presente desde antes de la germinación hasta que esta se presenta, ya que existen referencias en las que se menciona que puede favorecer este proceso. También se realizó una inoculación posterior con esta suspensión en forma

aérea cuando las plantas comenzaron a emerger, debido a que la presencia de la raíz en crecimiento acelerado favorece la sobrevivencia de esta bacteria en el suelo, ya que puede extraer los carbohidratos que requiere para la fijación de nitrógeno con mayor facilidad.

En el momento de la siembra se hicieron recuentos bacterianos con el fin de obtener una referencia a cerca de las poblaciones que se encontraron en los sustratos. Como se observa en la figura 4 hay una clara disminución en los sustratos con una parte de suelo, debido a que este fue tratado previamente con bicarbonato de sodio que funciona bien como un desinfectante para eliminar hongos y bacterias.

En cuanto a la germinación, este dato no es muy relevante para este estudio ya que el promedio alcanzado es el normal para el DRD 8108, tanto en el tiempo en que tardó en emerger como en el porcentaje del mismo.

Uno de los aspectos importantes a tomar en cuenta es la deficiencia de fósforo que se presentó. El sustrato en sí mismo parece tener bajas concentraciones de fósforo en formas disponibles para las plantas, demostrado en el hecho que solo en el caso de la fertilización química (el fertilizante agregado es un NPK) no hubo deficiencias de este elemento; y en el hecho de que el Fertibiol posee solubilizadores de fosfato y para que se presente el faltante de este en las plantas tiene que haber muy bajas concentraciones o ausente en el sustrato.

Una de las principales desventajas de las plantas crecidas con el tratamiento químico es que eran mucho más suculentas, y por tanto, más sensibles a la desecación y estrés por falta de agua; ya que al haber mayor concentración de sales en el sustrato hay una pérdida de agua por plasmólisis de las células.

Al repetir los recuentos al sustrato en el final del período de almácigo, se determinó que hay una clara disminución de las poblaciones de microorganismos. Esto se debió principalmente a dos factores, el aumento en la temperatura ambiente y la presencia de microorganismos altamente productores de sustancias inhibitorias para el crecimiento de otras especies.

En el primer caso es importante destacar, que todos los materiales utilizados venían del exterior del invernadero donde la temperatura ambiente es mucho más fresca, mientras que dentro de las instalaciones se pueden alcanzar temperaturas de hasta 35°C en un día soleado, y durante el tiempo del ensayo se presentaron días muy despejados. En cuanto al segundo rubro, se detectó la presencia de actinomicetes, de los que ha reportado en la literatura presentan antagonismos contra las bacterias del género *Azospirillum*; y también *Streptomyces spp* y *Bacillus cereus*, que son bacterias muy agresivas, altamente competitivas y que generan inhibidores de crecimiento. También es importante notar que al hacer este recuento en NFb, para determinar las UFC/g de fijadores de nitrógeno que se podían encontrar, se comprobó que únicamente en el tratamiento con Fertibiol las poblaciones de estos fueron superiores a los encontrados en el recuento general, esto se debe principalmente a que este producto es a base de *Azotobacter sp* que es una bacteria que produce cistes, y en esta forma es mucho más resistente a condiciones adversas, aunque durante este estado no presenta un metabolismo activo.

También es importante destacar que los recuentos más altos se presentaron en los tratamientos químicos, debido a la gran disponibilidad de nutrientes y poca competencia entre bacterias de la población habitual del sustrato.

Cuando una planta posee un exceso de nitrógeno, se vuelve suculenta, es decir, se observa crecimiento debido al aumento en la cantidad de agua contenida y no al aumento en la materia seca, por lo tanto un buen indicador de absorción de nitrógeno es el contenido de humedad de una planta. Al determinar este rubro en el ensayo se obtuvo que el tratamiento con *A. lipoferum* fue el más alto, por lo que parece indicar que hubo fijación de nitrógeno y que la falta de crecimiento se debió a la deficiencia del fosfato. Es importante destacar que el fosfato se transforma a formas no disponibles a un pH superior a 6.5, y que las bacterias de este género tienden a alcalinizar los sustratos.

Las bacterias del género *Azospirillum* son muy reconocidas por la estimulación que brindan al crecimiento de la raíz, esto se debe parcialmente a que promueve la división celular y la elongación de las raíces (Caballero, 2001), por lo que explica lo observado en las raíces en el tratamiento inoculado con *A. lipoferum*.

Una demostración de los beneficios del uso de biofertilizantes es que actúan como bioprotectores. Al observar la raíz desnuda se detectó la presencia de síntomas que indicaban la presencia de *Meloidogyne*, debido a que se observaron los típicos agallamientos o nodulaciones radicales. No se sabe mucho sobre el mecanismo de biocontrol, pero se observó que en aquellos tratamientos en los que se usaron biofertilizantes, la incidencia de estos síntomas fue muy baja.

Es importante destacar que en ningún momento las plantas mostraron los síntomas de la deficiencia de nitrógeno (clorosis, enanismo, crecimiento lento, plantas raquílicas y deformaciones), sino solamente la del fósforo (lignificación, aparición del color morado)

#### **d. Comprobación de la infección en la raíz**

Al analizar las muestras de raíz en medio NFb semi sólido se formó una película blanca y densa bajo la superficie del medio de cultivo, esto se considera como positivo para la presencia de estas bacterias. Esto se debe a que el medio es selectivo para fijadores de nitrógeno y a esa profundidad solamente los microaerofílicos pueden crecer.

En cuanto al tratamiento con Fertibiol, se identificaron las cepas de hongos y bacterias que componen el producto positivamente, por lo tanto se puede decir que las raíces de estas plantas se encontraban infectadas con el producto.

#### **e. Análisis estadístico**

Se encontraron diferencias significativas entre las repeticiones debidas posiblemente a las condiciones de luminosidad, ya que la repetición 2 con los mejores promedios se ubicó en medio de las demás. Al aumentar el crecimiento y encontrarse próximas unas de otras puede generar elongación y aumento del área foliar debido a la escasez de luz o de horas luz.

El tratamiento con fertilización química resultó mejor debido a que hay mayor disponibilidad de nutrientes en forma inmediata. Además las características de este fertilizante de liberación controlada hacen que genere ventajas como liberación de nutrientes cuando la planta lo requiere y en consecuencia evita fitotoxicidades. Además este tratamiento no se ve afectado por el ambiente y los microorganismos.

En cuanto a los tratamientos biológicos, su eficiencia pudo verse afectada por la presencia de antagonismos por las poblaciones naturales del sustrato o del suelo y en general por las condiciones ambientales del invernadero.

En aquellos casos en que el control fue superior que el tratamiento con *Azospirillum lipoferum* y considerando que las plantas muestreadas demostraron que hubo infección, se puede considerar lo que han descrito algunos autores y se supone como una de las desventajas del uso de los biofertilizantes, y es que estas bacterias extraen gran cantidad de carbohidratos de las plantas. Se supone que aunque esta extracción existe, la planta se ve mucho más beneficiada con la fijación del nitrógeno. Ahora bien, también es cierto que si la bacteria tiene otras fuentes de nitrógeno ya fijado, como los nitratos que naturalmente contiene el compostaje o el suelo del sustrato utilizado, esta se comporta como de vida libre y es una competidora con la planta por este componente. Si al acabarse el nitrógeno, y las poblaciones de la bacteria son mermadas por la situación, esta se aprovecha de la planta y comienza a fijar nitrógeno, primero para ella misma y luego para la planta. Toda esta situación genera estrés y falta de nutrientes para la planta, aunque llega el momento en que se alcanza el equilibrio y la planta recibe los beneficios de esta asociación.

En cuanto a la utilización del suelo, este ofrece la ventaja de enriquecer el sustrato con mayor cantidad de nutrientes. Aunque no existe diferencia significativa con los tratamientos sin suelo, es importante destacar que los promedios son ligeramente superiores y que por tanto se puede recomendar su uso aunque no es indispensable.

## CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

1. El método de laboratorio es efectivo para la producción de biofertilizante en pequeña escala.
2. El uso de esta metodología de laboratorio permite gran cantidad de bacterias con gránulos en una semana.
3. La conservación en buffer fosfato mantiene la viabilidad de las células y durante el proceso se eliminan los restos de medio de cultivo.
4. El bicarbonato de sodio es una buena opción para bajar la carga microbiana de los sustratos.
5. El mejor tratamiento en cuanto longitud y área foliar, es el químico por las características propias de estos productos.
6. La competencia entre las poblaciones de microorganismos es un factor importante a tomar en cuenta al utilizar biofertilizante debido al efecto negativo que tienen sobre el mismo.
7. *Azospirillum lipoferum* es un estimulante y bioprotector de la raíz.
8. Las plantas de los tratamientos biológicos fueron realmente infectadas por los mismos.
9. El segundo mejor tratamiento fue la aplicación del Fertibiol.
10. La metodología de laboratorio se puede mejorar utilizando un medio de cultivo que contenga una fuente de nitrógeno fijado.
11. Para obtener mejores resultados en este ensayo, recomendaría la desinfección de los sustratos con bicarbonato de sodio.

- 12.** Es importante combinar los productos biológicos con el fertilizante de liberación controlada, y probar diferentes concentraciones de ambos productos.
  
- 13.** También se podría probar el uso de sustratos menos nutritivos para evaluar el verdadero aporte de las bacterias a las plantas.

## BIBLIOGRAFÍA

- BASHAN, Y. 1998. "Azospirillum plant growth-promoting strains are nonpathogenics on tomato, pepper, cotton and wheat". Revista Canadian Microbiology, 44(2): 168-174
- BASHAN, Y ; BASHAN, L. 2002. "Protection of tomato seedlings against infection by *Pseudomonas syringae* pv Tomato by using the plant growth-promoting bacterium *Azospirillum brasilense*". Rev. Applied and Enviromental Microbiology. 68 (6): 2637-2643
- CABALLERO, J. 2001. El género *Azospirillum*. Centro de Investigación sobre Fijación de Nitrógeno, UNAM. Cuernavaca, México. Tomado de: <http://biblioweb.dgsca.unam.mx/libros/microbios/Cap10/capitulo.html>. Consultado en Agosto, 2003.
- COYNE, M. 2000. Microbiología del suelo: un enfoque exploratorio. Ed. Paraninfo. España. 416 p
- FAO, 1996. "Fijación biológica del Nitrógeno". Desde el surco. Impresión Publingraf. Quito, Ecuador. p 54-56.
- GADAGI, R; et al. 2002. "Biodiversity of *Azospirillum* in ornamental rizhoshpere soils of Karnataka. Tomado de: [www.sfst.org/Proceedings/17WCSS\\_CD/papers/0537.pdf](http://www.sfst.org/Proceedings/17WCSS_CD/papers/0537.pdf). Consultado en Agosto, 2003.
- GÓMEZ, J. 1996. "Sustitutos de la fertilización". Desde el surco. Impresión Publingraf. Quito, Ecuador. p 23-28

- GONZÁLEZ, A; RAISMAN, J. 2000. Ciclos Biogeoquímicos. Tomado de: <http://fai.unne.edu.ar/biología/planta/cicloge.htm#Nutrición>. Consultado el Agosto de 2003.
- HENRIKSEN, G.H. AND SPANSWICK, R.M. 1993. Investigation of the apparent induction of nitrate uptake in barley (*Hordeum vulgare* L.) using NO<sub>3</sub>- selective microelectrodes. *Rev Plant Physiol*. 103: 885-892.
- HERNÁNDEZ, T. 1996. "Abonos orgánicos y fertilizantes químicos: antagónicos o complementarios". Desde el surco. Impresión Publingraf. Quito, Ecuador. p 39-42
- KASS, D. 1998. "Fertilidad de los suelos". 1era impresión. EUNED. San José, Costa Rica. 233 p.
- KRIEG, N; DOBEREINER, J. 1984. "Bergey's Manual of Systematic Bacteriology". Sección 2. Volumen 1. Krieg, N; Holt, J (editores)
- LYNCH, J.M., 1982. "Soil biotechnology". Blackwell Scientific Publications. Oxford, London. 191 p.
- MADIGAN, M; MARTINKO, J; PARKER, J. 1999. Biología de los microorganismos. Ed Prentice Hall Iberia, 8ava edición. Madrid, España. 986 p.
- MOTSARA, MR.; BHATTACHARYYA, P. Y SRIVASTAVA, B. 1995. Biofertiliser Technology, Marketing and Usage. Fertiliser Development and Consultation Organisation. New Delhi, India. p. 1, 2, 4-8, 12, 13, 57, 58.

- PEREYRA, M. 2001. "Asimilación del nitrógeno por las plantas". Universidad de la Pampa. Tomado de: <http://www.agro.unlpam.edu.ar/quimica2/Asimilaci%C3%B3n%20del%20nitr%C3%B3geno%20en%20los%20vegetales.doc>. Consultado en Noviembre de 2003
- PÉREZ, S.; TORRALBA, A. 1997. *La fijación del Nitrógeno por los seres vivos*. Seminario Fisiología Vegetal, 21.01. Facultad Biología Oviedo. Tomado de: <http://scriptusnaturae.8m.com/Articulos/FijN/asociativa.html>. Consultado en Agosto de 2003.
- PINEDA, R. 1996. "A propósito de ecología, agricultura y fertilizantes". Desde el surco. Impresión Publingraf. Quito, Ecuador. p 43-51
- RAO, S.(editor), 1984. *Current Developments in Biological Nitrogen Fixation*. Gran Bretaña. 350 p.
- RUIZ, M. 1988. "Lecciones de agricultura biológica". Ediciones Mundi Prensa. Madrid, España. p 12-19
- SADASIVAN, L; NEYRA, C. 1985. "Flocculation in *Azospirillum brasilense* and *Azospirillum lipoferum*: exopolisaccharides and cyst formation". *Rev Journal of Bacteriology*. 163(2): 716-723.
- TAPIA, M; MASCARUA, M; CABALLERO, J. 1990. "Production of bacteriocins and siderophore-like activity by *Azospirillum brasilense*". *Rev. Microbios* 64(259): 73-93
- ZAADY, E; PEREVOLOTSKY, A. 1995. Enhancement of growth and establishment of oak seedlings (*Quercus ithaburensis* Decaisne) by inoculation with *Azospirillum brasilense*. *Rev. Forest Ecology and Management*. 72:(1). Marzo. 81-83 p.

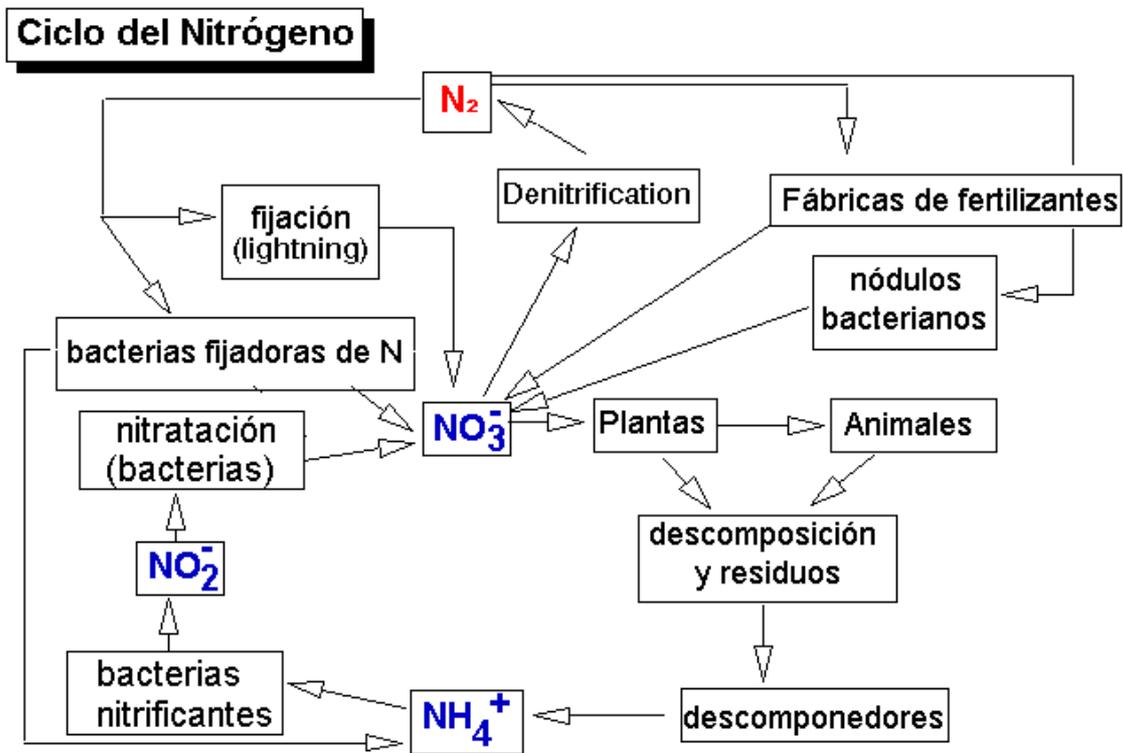
## ANEXO 1. Principales enzimas del suelo y su actividad

**Table 3.3** Enzymes in soil. (After Thornton & McLaren [26].)

Enzyme	Reaction catalysed
<b>Oxidoreductases</b>	
Catalase	$2\text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow 2\text{H}_2\text{O} + \text{O}_2$
Catechol oxidase (tyrosinase)	$o\text{-diphenol} + \frac{1}{2}\text{O}_2 \rightarrow o\text{-quinone} + \text{H}_2\text{O}$
Dehydrogenase	$\text{XH}_2 + \text{A} \rightarrow \text{X} + \text{AH}_2$
Diphenol oxidase	$p\text{-diphenol} + \frac{1}{2}\text{O}_2 \rightarrow p\text{-quinone} + \text{H}_2\text{O}$
Glucose oxidase	$\text{Glucose} + \text{O}_2 \rightarrow \text{gluconic acid} + \text{H}_2\text{O}_2$
Peroxidase and polyphenol oxidase	$\text{A} + \text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow \text{oxidized A} + \text{H}_2\text{O}$
Urate oxidase (uricase)	$\text{Uric acid} + \text{O}_2 \rightarrow \text{allantoin} + \text{CO}_2$
<b>Transferases</b>	
Transaminase	$\text{R}_1\text{R}_2\text{-CH-N}^+\text{H}_3 + \text{R}_3\text{R}_4\text{CO} \rightarrow \text{R}_3\text{R}_4\text{-CH-N}^+\text{H}_3 + \text{R}_1\text{R}_2\text{CO}$
Transglycosylase and levansucrase	$n\text{C}_{12}\text{H}_{22}\text{O}_{11} + \text{ROH} \rightarrow \text{H}(\text{C}_6\text{H}_{10}\text{O}_5)_n\text{OR} + n\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$
<b>Hydrolases</b>	
Acetylesterase	$\text{Acetic ester} + \text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{alcohol} + \text{acetic acid}$
$\alpha$ - and $\beta$ -amylase	Hydrolysis of 1,4-glucosidic bonds
Asparaginase	$\text{Asparagine} + \text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{aspartate} + \text{NH}_3$
Cellulase	Hydrolysis of $\beta$ -1,4-glucon bonds
Deamidase	$\text{Carboxylic acid amide} + \text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{carboxylic acid} + \text{NH}_3$
$\beta$ -fructofuranosidase (invertase, sucrose, saccharase)	$\beta\text{-fructofuranoside} + \text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{ROH} + \text{fructose}$
$\alpha$ - and $\beta$ -galactosidase	$\text{Galactoside} + \text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{ROH} + \text{galactose}$
$\alpha$ - and $\beta$ -glucosidase	$\text{Glucoside} + \text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{ROH} + \text{glucose}$
Inulase	Hydrolysis of $\beta$ -1,2-fructan bonds
Lichenase	Hydrolysis of $\beta$ -1,3-celotriose bonds
Lipase	$\text{Triglyceride} + 3\text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{glycerol} + 3 \text{ fatty acids}$
Metaphosphatase	$\text{Metaphosphate} \rightarrow \text{orthophosphate}$
Nucleotidase	Dephosphorylation of nucleotides
Phosphatase	$\text{Phosphate ester} + \text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{ROH} + \text{phosphate}$
Phytase	$\text{Inositol hexaphosphate} + 6\text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{inositol} + 6 \text{ phosphate}$
Protease	$\text{Proteins} \rightarrow \text{peptides and amino acids}$
Pyrophosphatase	$\text{Pyrophosphate} + \text{H}_2\text{O} \rightarrow 2 \text{ orthophosphate}$
Urease	$\text{Urea} \rightarrow 2\text{NH}_3 + \text{CO}_2$

TOMADO DE LYNCH, 1982

## ANEXO 2. Ciclo biogeoquímico del nitrógeno



### ANEXO 3. Algunos microorganismos fijadores de nitrógeno

Aerobios libres		
Quimio-organotrofos	Fototrofos	Quimio-litotrofos
Bacterias: <i>Azobacter</i> spp. <i>Klebsiella</i> <sup>a</sup> <i>Beijerinckia</i> <i>Bacillus polymyxa</i> <i>Mycobacterium flavum</i> <i>Azospirillum lipoferum</i> <i>Citrobacter freundii</i> <i>Acetobacter diazotrophicus</i> <i>Methylomonas</i> <i>Methylococcus</i>	Cianobacterias (varias, pero no todas)	<i>Alcaligenes</i> <i>Thiobacillus</i> (algunas especies)
Anaerobios libres		
Quimio-organotrofos	Fototrofos	Quimio-litotrofos
Bacteria: <i>Clostridium</i> spp. <i>Desulfovibrio</i> <i>Desulfotomaculum</i>	Bacteria: <i>Chromatium</i> <i>Thiocapsa</i> <i>Chlorobium</i> <i>Rhodospirillum</i> <i>Rhodopseudomonas</i> <i>Rhodomicrobium</i> <i>Rhodopila</i> <i>Rhodobacter</i> <i>Heliobacterium</i> <i>Heliobacillus</i> <i>Heliophilum</i>	Archaea: <i>Methanosarcina</i> <i>Methanococcus</i>
Simbióticos		
Plantas leguminosas	Plantas no leguminosas	
Soja, guisante, trébol, etc., en asociación con una bacteria del género <i>Rhizobium</i> , <i>Bradyrhizobium</i> , o <i>Azorhizobium</i>	<i>Alnus</i> , <i>Myrica</i> , <i>Ceanothus</i> , <i>Comptonia</i> , <i>Casuarina</i> ; en asociación con actinomicetos del género <i>Frankia</i>	
<sup>a</sup> La fijación de N <sub>2</sub> ocurre sólo bajo condiciones anóxicas.		

TOMADO DE MADIGAN, MARTINKO & PARKER, 1999

#### ANEXO 4. Características de algunos fijadores de N<sub>2</sub>

Género	Número de especies	Características	
<i>Azotobacter</i>	6	Bacilo grande; produce cistos; se encuentra principalmente en suelos de neutros a alcalinos	
<i>Azomonas</i>	3	Bacilo grande; sin cistos; principalmente acuático	
<i>Azospirillum</i>	4	Bacilo microaerofílico; asociado a plantas	
<i>Beijerinckia</i>	4	Bacilo en forma de pera con cuerpos grasos grandes en cada extremo; producción extensa de limo; habita en suelos ácidos	
<i>Derxia</i>	1	Bacilos; forma colonias toscas y arrugadas	

TOMADO DE MADIGAN, MARTINKO & PARKER, 1999

#### ANEXO 5. Composición de los medios de cultivo

NFb		Agar Nutritivo	
Ácido málico	5 g	Peptona	5 g
KOH	4 g	Extracto de carne	3 g
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0.5 g	Agar	15 g
FeSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	trazas	Agua deionizada	1000 ml
MnSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0.01 g		
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0.01 g	<b>PDA</b>	
NaCl	0.02 g	Papas	200 g
CaCl <sub>2</sub>	0.01 g	Dextrosa	20 g
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub>	0.002 g	Extracto de levadura	1 g
Azul de bromotimol		Peptona	2.5 g
(0.5% m/v en etanol)	2 ml	Agar	15 g
Biotina	0.1 mg	Agua deionizada	1000 ml
Agua deionizada	1000 ml	Ácido láctico 10%	3 ml

## **ANEXO 6. Metodología utilizada para hacer los recuentos a muestras sólidas y líquidas**

1. Se toman 10 gramos de muestra y se agrega a una botella con 90 ml de agua deionizada estéril. En caso de una muestra líquida se toma 1 ml y se adiciona a 9 ml de agua deionizada estéril.
2. Se pone en agitación en un agitador orbital a máxima velocidad por 30 minutos. Esta dilución es  $10^{-1}$ . En el caso de muestras líquidas este paso no es necesario.
3. Se hacen diluciones seriadas hasta  $10^{-5}$ , tomando 1 ml de la dilución y se agrega a 9 ml de agua destilada estéril en un tubo de ensayo.
4. Se toman 0.1 ml de las tres últimas diluciones y se colocan en la superficie de una placa de petri con Agar Nutritivo.
5. Se incuban a  $35^{\circ}\text{C}$ , de dos a tres días y se cuentan las UFC en la placa.
6. Se reporta como UFC/gramo de muestra o UFC/mililitro de muestra.

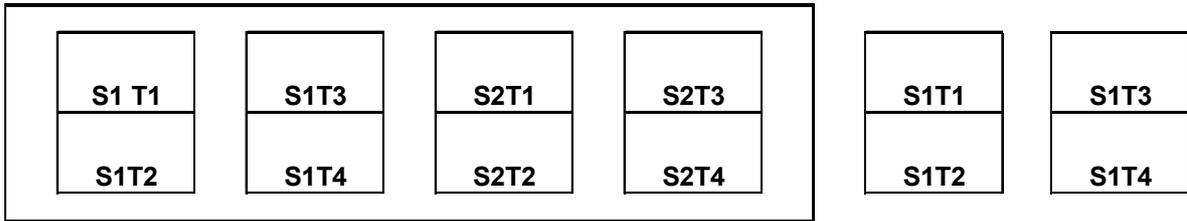
## **ANEXO 7. Preparación de buffer fosfato 34 mM a pH 6.1**

1. Se pesan 5.9 gramos de  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  y se disuelven en 1 L de agua deionizada.
2. Se ajusta el pH a 6.1
3. Se esteriliza en autoclave a  $121^{\circ}\text{C}$  por 40 minutos.

## **ANEXO 8. Medición de pH de una muestra de suelo**

1. Se toman 10 gramos de muestra y se adicionan 10 ml de agua deionizada.
2. Se pone en agitación por 5 minutos, se deja reposar 10 minutos y luego se agita dos minutos más.
3. Durante esta última agitación ya se puede medir el pH con el pHmetro.

**ANEXO 9. Distribución espacial de las parcelas experimentales y sus repeticiones**



... Repetición 1

Repetición 2...

**S1T1:** Compost + Peat moss

**S1T2:** Compost + Peat moss + Osmocote

**S1T3:** Compost + Peat moss + Biofertilizante a base de *A. lipoferum*

**S1T4:** Compost + Peat moss + Fertibiol

**S2T1:** Compost + Peat moss + Suelo

**S2T2:** Compost + Peat moss + Suelo + Osmocote

**S2T3:** Compost + Peat moss + Suelo + Biofertilizante a base de *A. lipoferum*

**S2T4:** Compost + Peat moss + Suelo + Fertibiol

**ANEXO 10. Resultados obtenidos a lo largo del desarrollo del biofertilizante**

<b>FASE</b>	<b>CONDICIÓN</b>	<b>MEDIO DEL RECUENTO</b>	<b>CONTEO</b>	<b>UNIDAD</b>
<b>A</b>	Recuento a caldo nutritivo con AI-3	AN	$1.0 \times 10^6$	UFC/ml
<b>B</b>	50 ml de CN con AI-3, centrifugado y resuspendido en 30 ml buffer	AN	$3.0 \times 10^6$	UFC/ml
		NFb	$7.9 \times 10^7$	UFC/ml
<b>C</b>	NFb líq. Inoculado con bacterias centrif con 2d de incubación	AN	$2.0 \times 10^6$	UFC/ml
		NFb	$1.1 \times 10^7$	UFC/ml
	NFb líq. Inoculado con bacterias centrif con 5d de incubación	AN	$1.0 \times 10^8$	UFC/ml
		NFb	$2.0 \times 10^6$	UFC/ml
<b>D</b>	Recuento inmediato a la resuspensión en buffer	AN	$1.0 \times 10^7$	UFC/ml
		NFb	$4.0 \times 10^6$	UFC/ml
	Recuento a la resuspensión en buffer con 5d a 4°C	AN	$8.5 \times 10^6$	UFC/ml
		NFb	$2.9 \times 10^6$	UFC/ml
<b>E</b>	Recuento al compostaje	AN	$1.7 \times 10^7$	UFC/ml
	Sustrato 1(100 g) con AI-3 en buffer desde CN (30 ml) inmediato al inóculo	AN	$1.3 \times 10^7$	UFC/g
		NFb	$2.4 \times 10^7$	UFC/g
	Sustrato 1(100 g) con AI-3 en buffer desde CN (30 ml) 2d de inoculado	AN	$2.4 \times 10^7$	UFC/g
		NFb	$1.9 \times 10^7$	UFC/g
	Sustrato 1(100 g) con AI-3 en buffer desde NFb (30 ml) inmediato al inóculo	AN	$1.9 \times 10^7$	UFC/g
		NFb	$3.6 \times 10^7$	UFC/g
	Sustrato 1(100 g) con AI-3 en buffer desde NFb (30 ml) 8d de inoculado	AN	$1.4 \times 10^6$	UFC/g
NFb		$4.5 \times 10^6$	UFC/g	

Se consideró como Fase A, al crecimiento en caldo nutritivo a 28°C de dos a tres días en agitación; Fase B, a la centrifugación 25 minutos a 4000 rpm; Fase C, al crecimiento en NFb líquido a 35°C de dos a cinco días en agitación; Fase D, a la resuspensión de las bacterias en el buffer fosfato y mantenimiento en refrigeración a 4°C; y Fase E, a la mezcla con el sustrato.

**ANEXO 11. Resultados de la prueba de Tukey para todos los tratamientos, en el caso de la variable longitud hasta el ápice.**

	{1}	{2}	{3}	{4}	{5}	{6}	{7}	{8}
R1S1T1	3.822727	4.107971	4.798666	4.489583	3.925758	3.544697	3.831944	4.215333
R2S1T1	0.847187638	0.847187638	2.91467E-05	0.000525892	0.999997914	0.87160182	1	0.331568241
R1S1T2	2.91467E-05	0.000160098	0.000160098	0.68417418	2.92063E-05	2.91467E-05	2.91467E-05	0.002060056
R2S1T2	0.000525892	0.342478871	0.68417418		0.010387599	2.91467E-05	0.000284195	0.842881083
R1S1T3	0.999997914	0.997323632	2.92063E-05	0.010387599		0.385227203	0.999999404	0.831336617
R2S1T3	0.87160182	0.01053828	2.91467E-05	2.91467E-05	0.385227203		0.839964867	0.000467956
R1S1T4	1	0.857691824	2.91467E-05	0.000284195	0.999999404	0.839964867		0.297498524
R2S1T4	0.331568241	0.999995053	0.002060056	0.842881083	0.831336617	0.000467956	0.297498524	
R1S2T1	0.551564336	0.001446366	2.91467E-05	2.91467E-05	0.129194558	1	0.503161073	6.62208E-05
R2S2T1	0.99999994	0.441252291	2.91467E-05	4.72069E-05	0.997749925	0.992122173	0.99999762	0.074931622
R1S2T2	0.107444644	0.99765563	0.026619434	0.988086462	0.500037074	6.85453E-05	0.10551548	1
R2S2T2	2.91467E-05	2.91467E-05	0.96666497	0.013875484	2.91467E-05	2.91467E-05	2.91467E-05	2.94447E-05
R1S2T3	0.282772541	0.000167131	2.91467E-05	2.91467E-05	0.041460752	0.999969423	0.183574796	3.01003E-05
R2S2T3	0.192502558	0.999788582	0.011620462	0.953885555	0.669852138	0.000157535	0.191830218	1
R1S2T4	0.998646736	0.999989212	3.06368E-05	0.041922808		0.134039104	0.999075472	0.976035655
R2S2T4	0.989457011	0.999999994	4.22001E-05	0.111731589	0.999997437	0.066003978	0.993360937	0.996833444

... Continuación del anexo 11

{9}	{10}	{11}	{12}	{13}	{14}	{15}	{16}
3.474242	3.746377	4.284058	5.018667	3.418750	4.251449	3.994203	4.030303
0.551564336	0.999999994	0.107444644	2.91467E-05	0.282772541	0.192502558	0.998646736	0.989457011
0.001446366	0.441252291	0.99765563	2.91467E-05	0.000167131	0.999788582	0.999989212	0.999999994
2.91467E-05	2.91467E-05	0.026619434	0.966666497	2.91467E-05	0.011620462	3.06368E-05	4.22001E-05
2.91467E-05	4.72069E-05	0.988086462	0.013875484	2.91467E-05	0.953885555	0.041922808	0.111731589
0.129194558	0.997749925	0.500037074	2.91467E-05	0.041460752	0.669852138	1	0.999997437
1	0.992122173	6.85453E-05	2.91467E-05	0.999969423	0.000157535	0.134039104	0.066003978
0.503161073	0.999999762	0.10551548	2.91467E-05	0.183574796	0.191830218	0.999075472	0.993360937
6.62208E-05	0.074931622	1	2.94447E-05	3.01003E-05	1	0.976035655	0.996833444
0.889677763	0.889677763	3.16501E-05	2.91467E-05	1	3.83258E-05	0.030813992	0.01270318
0.889677763		0.014914393	2.91467E-05	0.622285724	0.033452094	0.935938239	0.851833344
3.16501E-05	0.014914393		5.45382E-05	2.92063E-05	1	0.804754794	0.935207129
2.91467E-05	2.91467E-05	5.45382E-05		2.91467E-05	3.59416E-05	2.91467E-05	2.91467E-05
1	0.622285724	2.92063E-05	2.91467E-05		2.96235E-05	0.00537169	0.002781689
3.83258E-05	0.033452094	1	3.59416E-05	2.96235E-05		0.914256811	0.980503082
0.030813992	0.935938239	0.804754794	2.91467E-05	0.00537169	0.914256811		1
0.01270318	0.851833344	0.935207129	2.91467E-05	0.002781689	0.980503082	1	

**ANEXO 12. Resultados de la prueba de Tukey para todos los tratamientos, en el caso de la variable ancho de hoja.**

	{1}	{2}	{3}	{4}	{5}	{6}	{7}	{8}	{9}	{10}	{11}	{12}
R1S1T1	1.302500	1.524167	1.350800	1.872800	2.016800	1.923200	1.476087	1.606818	1.330476	1.400417	1.435200	1.446667
R2S1T1	0.0355908	0.0355908	0.3458339	1.77E-05	1.77E-05	1.77E-05	0.3876082	0.002725	1	0.9946521	0.8516144	0.7281671
R3S1T1	1	0.3458339	1.77E-05	1.77E-05	1.77E-05	1.77E-05	0.92626	0.0080312	1	0.9999999	0.9991634	0.9959978
R1S1T2	1.77E-05	1.854E-05	1.77E-05	0.6930746	0.6930746	0.9999999	1.77E-05	0.0041152	1.77E-05	1.77E-05	1.77E-05	1.77E-05
R2S1T2	1.77E-05	1.77E-05	1.77E-05	0.6930746	0.9961886	0.9961886	1.77E-05	1.77E-05	1.77E-05	1.77E-05	1.77E-05	1.77E-05
R3S1T2	1.77E-05	1.77E-05	1.77E-05	0.9999999	0.9961886	0.9961886	1.77E-05	9.906E-05	1.77E-05	1.77E-05	1.77E-05	1.77E-05
R1S1T3	0.3876082	1	0.92626	1.77E-05	1.77E-05	1.77E-05	0.9106753	0.9106753	0.8178518	0.9999284	1	1
R2S1T3	0.0002725	0.999783	0.0080312	0.0041152	1.77E-05	9.906E-05	0.9106753	0.0031203	0.0031203	0.1280053	0.4601418	0.6090037
R3S1T3	1	0.2600917	1	1.77E-05	1.77E-05	1.77E-05	0.8178518	0.0031203	0.9999921	0.9999921	0.9946199	0.9798805
R1S1T4	0.9946521	0.9196918	0.9999999	1.77E-05	1.77E-05	1.77E-05	0.9999284	0.1280053	0.9999921	0.9999921	1	1
R2S1T4	0.8516144	0.9986356	0.9991634	1.77E-05	1.77E-05	1.77E-05	1	0.4601418	0.9946199	1	1	1
R3S1T4	0.7281671	0.9998463	0.9959978	1.77E-05	1.77E-05	1.77E-05	1	0.6090037	0.9798805	1	1	1
R1S2T1	1	0.4200857	1	1.77E-05	1.77E-05	1.77E-05	0.9277045	0.0082701	1	0.9999999	0.9994178	0.9965364
R2S2T1	0.3263262	1	0.8924778	1.77E-05	1.77E-05	1.77E-05	1	0.9396627	0.7648054	0.9997807	1	1
R3S2T1	1	0.0598284	1	1.77E-05	1.77E-05	1.77E-05	0.5051576	0.000514	1	0.9986844	0.9210148	0.8299004
R1S2T2	1.77E-05	0.000539	1.77E-05	0.9999987	0.1123902	0.9798756	2.432E-05	0.1341993	1.77E-05	1.77E-05	1.776E-05	1.8E-05
R2S2T2	1.77E-05	1.77E-05	1.77E-05	1	0.9551296	1	1.77E-05	0.0004982	1.77E-05	1.77E-05	1.77E-05	1.77E-05
R3S2T2	1.77E-05	0.0001484	1.77E-05	1	0.3376784	0.9993852	1.925E-05	0.0428431	1.77E-05	1.77E-05	1.77E-05	1.776E-05
R1S2T3	1	0.1095904	1	1.77E-05	1.77E-05	1.77E-05	0.6597434	0.0011942	1	0.9998595	0.9719058	0.9222228
R2S2T3	0.9999959	0.6013258	1	1.77E-05	1.77E-05	1.77E-05	0.9836257	0.0219686	1	1	0.9999884	0.9998278
R3S2T3	0.9999993	0.6536362	1	1.77E-05	1.77E-05	1.77E-05	0.9867169	0.0253682	1	1	0.9999886	0.9998461
R1S2T4	1.77E-05	0.4864777	2.265E-05	0.2831232	3.421E-05	0.0238948	0.0706751	0.9997591	2.08E-05	0.0004807	0.0059513	0.0127282
R2S2T4	1.776E-05	0.6080545	2.992E-05	0.1981661	2.462E-05	0.01357	0.1115522	0.9999666	2.527E-05	0.0009421	0.0109489	0.02249
R3S2T4	0.0624171	1	0.4447387	2.158E-05	1.77E-05	1.77E-05	1	0.9997591	0.2651122	0.9500012	0.9993359	0.9999345

... Continuación del anexo 12

{13}	{14}	{15}	{16}	{17}	{18}	{19}	{20}	{21}	{22}	{23}	{24}
1.345238	1.481304	1.311667	1.812174	1.902400	1.835000	1.323333	1.366956	1.363809	1.690000	1.680870	1.523636
1	0.3263262	1	1.77E-05	1.77E-05	1.77E-05	1	0.9999959	0.9999993	1.77E-05	1.77E-05	0.0624171
0.4200857	1	0.0598284	0.000539	1.77E-05	0.0001484	0.1095904	0.6013258	0.6536362	0.4864777	0.6080545	1
1	0.8924778	1	1.77E-05	1.77E-05	1.77E-05	1	1	1	2.265E-05	2.992E-05	0.4447387
1.77E-05	1.77E-05	1.77E-05	0.9999987	1	1	1.77E-05	1.77E-05	1.77E-05	0.2831232	0.1981661	2.158E-05
1.77E-05	1.77E-05	1.77E-05	0.1123902	0.9551296	0.3376784	1.77E-05	1.77E-05	1.77E-05	3.421E-05	2.462E-05	1.77E-05
1.77E-05	1.77E-05	1.77E-05	0.9798756	1	0.9993852	1.77E-05	1.77E-05	1.77E-05	0.0238948	0.01357	1.77E-05
0.9277045	1	0.5051576	2.432E-05	1.77E-05	1.925E-05	0.6597434	0.9836257	0.9867169	0.0706751	0.1115522	1
0.0082701	0.9396627	0.000514	0.1341993	0.0004982	0.0428431	0.0011942	0.0219686	0.0253682	0.9997591	0.9999666	0.9997591
1	0.7648054	1	1.77E-05	1.77E-05	1.77E-05	1	1	1	2.08E-05	2.527E-05	0.2651122
0.9999999	0.9997807	0.9986844	1.77E-05	1.77E-05	1.77E-05	0.9998595	1	1	0.0004807	0.0009421	0.9500012
0.9994178	1	0.9210148	1.776E-05	1.77E-05	1.77E-05	0.9719058	0.9999884	0.9999886	0.0059513	0.0109489	0.999359
0.9965364	1	0.8299004	1.8E-05	1.77E-05	1.776E-05	0.9222228	0.9998278	0.9998461	0.0127282	0.02249	0.9999345
0.8960032	0.8960032	1	1.77E-05	1.77E-05	1.77E-05	1	1	1	3.058E-05	4.715E-05	0.4264951
0.8960032	0.4370383	0.4370383	2.897E-05	1.77E-05	2.015E-05	0.5912077	0.971696	0.9770655	0.0921744	0.1422507	1
1	0.4370383	1.77E-05	1.77E-05	1.77E-05	1.77E-05	1	0.9999998	1	1.776E-05	1.794E-05	0.0986958
1.77E-05	2.897E-05	1.77E-05	0.9987755	0.9987755	1	1.77E-05	1.77E-05	1.77E-05	0.9424753	0.8865414	0.0008277
1.77E-05	1.77E-05	1.77E-05	0.9987755	0.9987755	0.9999939	1.77E-05	1.77E-05	1.77E-05	0.0764294	0.0469326	1.794E-05
1.77E-05	2.015E-05	1.77E-05	1	0.9999939	1	1.77E-05	1.77E-05	1.77E-05	0.7901918	0.6853867	0.0001426
1	0.5912077	1	1.77E-05	1.77E-05	1.77E-05	1	1	1	1.794E-05	1.842E-05	0.1673995
1	0.971696	0.9999998	1.77E-05	1.77E-05	1.77E-05	1	1	1	4.113E-05	7.206E-05	0.6535151
1	0.9770655	1	1.77E-05	1.77E-05	1.77E-05	1	1	1	8.428E-05	0.0001608	0.6601788
3.058E-05	0.0921744	1.776E-05	0.9424753	0.0764294	0.7901918	1.794E-05	4.113E-05	8.428E-05	1	1	0.5279585
4.715E-05	0.1422507	1.794E-05	0.8865414	0.0469326	0.6853867	1.842E-05	7.206E-05	0.0001608	1	1	0.6464939
0.4264951	1	0.0986958	0.0008277	1.794E-05	0.0001426	0.1673995	0.6535151	0.6601788	0.5279585	0.6464939	

**INFORMACION ESTUDIANTE**

**NOMBRE:** MARTA ELENA RAMIREZ OROZCO