



UNIVERSIDAD TÉCNICA DE AMBATO

FACULTAD DE CIENCIA E INGENIERÍA EN ALIMENTOS

CARRERA DE INGENIERÍA BIOQUÍMICA



TEMA:

EVALUACIÓN DE SOPORTES SÓLIDOS Y LÍQUIDOS, PARA LA PRODUCCIÓN DE UN BIOFERTILIZANTE A BASE DE *Azospirillum* spp. APLICABLE AL CULTIVO DE MAÍZ (*Zea mays* L.)

Trabajo de Investigación (Graduación), Modalidad: Trabajo Estructurado de Manera Independiente (TEMI). Presentado como Requisito Previo a la Obtención del título de Ingeniera Bioquímica, otorgado por la Universidad Técnica de Ambato, a través de la Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos.

AUTOR: Yolanda Elizabeth Pallo Barona

TUTOR: Ramiro Velasteguí Sánchez, Ing. Agr., MSc, PhD

Ambato – Ecuador

2010-2011

APROBACIÓN DEL TUTOR

En calidad de tutor del trabajo estructurado de manera independiente (TEMI) sobre el tema: "EVALUACIÓN DE SOPORTES SÓLIDOS Y LÍQUIDOS, PARA LA PRODUCCIÓN DE UN BIOFERTILIZANTE A BASE DE *Azospirillum* spp. APLICABLE AL CULTIVO DE MAÍZ (*Zea mays* L.)" desarrollado por Yolanda Elizabeth Pallo Barona, egresada de la Carrera de Ingeniería Bioquímica, de la Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos, Universidad Técnica de Ambato, certifico que el trabajo fue realizado por la persona indicada y considero que dicho informe investigativo reúne los requisitos y méritos suficientes para ser sometidos a la evaluación del Tribunal de Grado, que el Honorable Consejo Directivo designe, para su correspondiente estudio y calificación.

Ambato, Julio 2011

TUTOR

.....
Ramiro Velasteguí Sánchez, Ing. Agr., MSc, PhD

PROFESOR DE LA FCIAL

AUTORÍA DE LA INVESTIGACIÓN

El presente Trabajo de Investigación “EVALUACIÓN DE SOPORTES SÓLIDOS Y LÍQUIDOS, PARA LA PRODUCCIÓN DE UN BIOFERTILIZANTE A BASE DE *Azospirillum* spp. APLICABLE AL CULTIVO DE MAÍZ (*Zea mays* L.)” es absolutamente original, auténtico y personal; en tal virtud el contenido, efectos legales y académicos que se desprenden del mismo son de exclusiva responsabilidad de la autora.

Ambato, Octubre 2011

.....

Yolanda Elizabeth Pallo Barona

CI. 180415049-6

APROBACIÓN DEL TRIBUNAL CALIFICADOR

Los miembros del Tribunal Calificador, de conformidad con las disposiciones reglamentarias vigentes en la UNIVERSIDAD TÉCNICA DE AMBATO, aprueban el presente Trabajo de Investigación bajo el tema "EVALUACIÓN DE SOPORTES SÓLIDOS Y LÍQUIDOS, PARA LA PRODUCCIÓN DE UN BIOFERTILIZANTE A BASE DE *Azospirillum* spp. APLICABLE AL CULTIVO DE MAÍZ (*Zea mays* L.)"

Ambato, Octubre 2011

Para constancia firman:

.....

PRESIDENTE DEL TRIBUNAL

Ing. Rommel Rivera

.....

MIEMBRO DEL TRIBUNAL

Dr. Milton Ramos PhD

.....

MIEMBRO DEL TRIBUNAL

Ing. Homero Vargas

2011

DEDICATORIA

Con el mayor amor del mundo quiero dedicar el presente trabajo a mis adorados hijos: Dany Michelle y Andrés Damián, por ser el centro de mi universo y el motor de mi vida.

A mis padres: Sebastián y Laura, por su gran ejemplo de superación y trabajo, por su invaluable apoyo en cada instante de mi vida, por brindarme tan maravillosa familia y haberme educado con amor y paciencia inculcando en mí valores de responsabilidad, constancia, respeto y verdad.

A mi esposo, Víctor, por su amor y respaldo, durante estos años juntos.

A mi hermano, David, por transmitirme su alegría y a todas las personas que confiaron en mí.

Yolanda Elizabeth Pallo Barona

AGRADECIMIENTO

En primer lugar Agradezco a Dios, por ser mi principal guía, por estar siempre junto a mí, transmitiéndome voluntad y empeño, para culminar con una de mis metas.

A mi familia por su infinito amor, por brindarme su incondicional apoyo, porque sin su ayuda, no hubiese logrado realizar esta investigación.

Mi más sincero agradecimiento al Instituto Nacional Autónomo de Investigaciones Agropecuarias, principalmente al Programa de Maíz, al Ing. Carlos Yáñez, director del Proyecto, por brindarme la oportunidad de formar parte de este gran reto. De manera particular deseo expresar un profundo agradecimiento al Ing. Francisco Clavijo, Técnico responsable del Proyecto, por haber depositado su confianza en mí, por estar siempre pendiente de mi investigación, por todos los momentos de trabajo en equipo compartidos, por su comprensión y amistad.

Al Dr. Ramiro Velasteguí, Tutor de Investigación, por confiar en mí, por su predisposición y guía.

A mis amigos y compañeros del INIAP: Darío, César, Alex, Diego, Andrea, Adriana y Alicia, por hacer que el trabajo sea más llevadero, por su preocupación, afecto, oportunas palabras de aliento y momentos de risas compartidos.

A Lily C., Lily L., Francisco y David, por su invaluable amistad verdadera.

A todas las personas que de alguna manera contribuyeron para la culminación de esta etapa tan importante de mi vida.

ÍNDICE GENERAL DE CONTENIDOS

PÁGINAS PRELIMINARES

Tema.....	i
Aprobación del Tutor.....	ii
Autoría.....	iii
Aprobación del Tribunal de Grado.....	iv
Dedicatoria.....	v
Agradecimiento.....	vi
Índice General de Contenidos.....	vii
Índice de Tablas.....	xiii
Índice de Figuras.....	xiii
Resumen Ejecutivo.....	xiv

CAPÍTULO I

EL PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN

1.1 Tema.....	1
1.2 Planteamiento del Problema.....	1
1.2.1 Contextualización.....	2
1.2.2 Análisis Crítico.....	4
1.2.3 Prognosis.....	5
1.2.4 Formulación del problema.....	6
1.2.5 Preguntas directrices.....	6

1.2.6 Delimitación del Objeto de Investigación.....	6
1.3 Justificación.....	6
1.4 Objetivos.....	7
1.4.1 General:.....	7
1.4.2 Específicos:.....	8

CAPÍTULO II

MARCO TEÓRICO

2.1 Antecedentes Investigativos.....	9
2.1.1 Fundamentación Teórico Científica.	11
2.1.1.1 Biofertilizantes.	11
2.1.1.2 Soportes empleados para biofertilizantes.....	12
2.1.1.3 Nutrición microbiana.....	13
2.1.1.3.1 Macronutrientes.....	14
2.1.1.3.2 Micronutrientes (elementos traza).....	15
2.1.1.4 Crecimiento bacteriano.	15
2.1.1.4.1 Fase de latencia.	16
2.1.1.4.2 Fase exponencial.	16
2.1.1.4.3 Fase estacionaria.....	16
2.1.1.4.4 Fase de senescencia y muerte.....	16
2.1.1.5 El género <i>Azospirillum</i>	17
2.1.1.5.1 Aislamiento	18

2.1.1.5.2 Bioquímica de la bacteria.....	19
2.2 Fundamentación Filosófica.....	20
2.3 Fundamentación Legal.	21
2.4 Categorías Fundamentales.	22
2.5 Hipótesis.....	23
2.5.1 Hipótesis Nula (Ho).....	23
2.5.2 Hipótesis Alternativa (Hi).....	23
2.6 Señalamiento de las variables de las hipótesis.....	23
2.6.1 Variable independiente.....	23
2.6.2 Variable dependiente.....	23

CAPÍTULO III

METODOLOGÍA

3.1 Enfoque.....	24
3.2 Modalidad básica de investigación.....	24
3.2.1 Bibliográfica-documental	24
3.2.2 Experimental.....	24
3.3 Nivel o tipo de investigación.....	25
3.3.1 Exploratorio	25
3.3.2 Descriptivo.....	25
3.4 Población y muestra.....	25
3.4.1 Unidad experimental	25

3.4.2 Factores en estudio.....	26
3.4.3 Tratamientos.....	27
3.4.4 Análisis estadístico.....	27
3.4.5 Análisis funcional.....	28
3.5 Operacionalización de variables.....	28
3.6 Plan derecolección de información	31
3.6.1 Métodos y técnicas de investigación.....	31
3.6.1.1 Reactivaciónn y purificación de cepas liofilizadas.....	31
3.6.1.2 Reactivación de la cepa apartir de raíces de maíz	31
3.6.1.3 Producción de suspensión bacteriana	33
3.6.1.4 Caracterización de material empleado para soportes sólidos.....	33
3.6.1.5 Preparación de inoculantes sólidos.....	34
3.6.1.6 Preparación de inoculantes líquidos.....	35
3.6.1.7 Análisis inicial de minerales totales.....	36
3.6.2 Métodos de evaluación.....	36
3.6.2.1 Sobrevivencia.....	36
3.6.2.2 pH	38
3.6.2.3 Porcentaje de materia orgánica en soportes sólidos	38
3.6.2.4 Porcentaje de contaminación.....	38
3.6.2.3 Porcentaje de materia orgánica en soportes sólidos	38
3.6.3 Análisis Post-evaluación.....	38

3.6.3.1 Pruebas Bioquímicas.....	38
3.6.3.2 Análisis final de minerales totales	38
3.6.3.3 Análisis de costos de producción.....	39
3.7 Plan de procesamiento y análisis de la información.....	39

CAPÍTULO IV

ANÁLISIS E INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS

4.1 Pruebas Bioquímicas en cepa reactivada.....	40
4.2 Análisis de resultados.	41
4.2.1 Evaluación de soportes sólidos y líquidos durante seis meses de almacenamiento.	41
4.2.1.1 Sobrevivencia de <i>Azospirillum</i> spp.	41
4.2.1.2 pH	45
4.2.1.3 Porcentaje de materia orgánica en soportes sólidos	47
4.2.1.4 Porcentaje de contaminación.....	47
4.2.2 Análisis Post-evaluación.....	48
4.2.2.1 Pruebas Bioquímicas.....	48
4.2.2.2 Análisis de costos de producción de los mejores tratamientos	48
4.3 Verificación de la Hipótesis.....	49

CAPÍTULO V

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

5.1 Conclusiones.....	50
-----------------------	----

5.2 Recomendaciones.....	51
--------------------------	----

CAPÍTULO VI

PROPUESTA

6.1 Datos Informativos.....	53
6.2 Antecedentes de la propuesta.....	54
6.3 Justificación.....	55
6.4 Objetivos.....	55
6.4.1 General.....	55
6.4.2 Específicos.....	56
6.5 Análisis de Factibilidad.....	56
6.6 Fundamentación.....	57
6.6.1 Biofertilizantes.....	57
6.6.2 Mecanismos de estimulación del crecimiento de las plantas.....	57
6.7 Metodología. Modelo operativo.....	60
6.8 Administración.....	61
6.9 Previsión de la Evaluación.....	62
MATERIAL DE REFERENCIA.....	63

ANEXOS

ANEXO A: Medios de cultivo

ANEXO B: Metodología de Pruebas Bioquímicas

ANEXO C: Preparación de inoculantes sólidos y líquidos

ANEXO D: Resultados

ANEXO E: Análisis estadístico

ANEXO F: Fotografías

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla N. 1. Esquema del análisis de varianza, para la sobrevivencia de <i>Azospirillum</i> spp. en seis soportes sólidos o seis soportes líquidos.....	28
Tabla N. 2. Esquema del análisis de varianza, para materia orgánica y pH para cada tratamiento durante 180 días de almacenamiento.....	28
Tabla N.3. Operacionalización de la variable Independiente.....	29
Tabla N.4. Operacionalización de la variable Dependiente.....	30
Tabla N.5. Valores Económicos de la Propuesta.....	57
Tabla N.6. Modelo Operativo (Plan de acción).....	60
Tabla N.7. Administración de la Propuesta.....	61
Tabla N.8. Previsión de la Evaluación de la investigación propuesta.....	62

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura N.1. Árbol del Problema (Relación Causa-Efecto)	4
Figura N.2. Red de Inclusión.....	22

RESUMEN EJECUTIVO

En los últimos años debido al impacto negativo de la agricultura en el ambiente y a los altos costos de producción se ha venido planteando el concepto de agricultura sostenible, definida como la manera de cultivar el suelo conservando al máximo la calidad medioambiental, permitiendo ingresos adecuados a los agricultores y generando suficientes alimentos a los consumidores, con la finalidad de preservar y regenerar los recursos naturales y producir alimentos sanos y seguros (Benbrook, 1999). Una alternativa para practicar este concepto, es el uso de biofertilizantes, que tienen como principio activo microorganismos con la capacidad de influenciar positivamente el crecimiento de las plantas, como es el caso del género *Azospirillum*. Para integrar la bacteria al cultivo, es necesario un medio que le brinde protección y los requerimientos necesarios que la mantengan viable desde el momento de la producción del biofertilizante hasta su aplicación en campo, por lo cual se realizó la evaluación de soportes sólidos y líquidos, para la producción de un biofertilizante a base de la cepa C2-Bolívar de *Azospirillum* spp. aplicable al cultivo de maíz.

Los soporte sólidos empleados fueron: Turba de Chimborazo, Mezcla (Turba de Chimborazo + 1% CaCO₃ + 1% raíz de maíz), Turba con vermiculita, Humus de lombriz, zeolita y perlas de alginato, mientras que los soportes líquidos estuvieron conformados por soluciones de: Carboximetilcelulosa al 5%, Medio ácido málico-rojo congo al 35%, Caldo nutritivo al 70%, Medio NFB al 70%, melaza al 2% y solución aproximada a biofertilizante comercial. Se evaluaron doce tratamientos, los cuales estuvieron constituidos por los seis soportes sólidos y seis líquidos inoculados con la cepa C2-Bolívar de *Azospirillum* spp. se almacenaron a temperatura ambiente durante 180 días, en fundas de aluminio polietileno selladas, con 30 ml del producto cada una. Se realizaron pruebas de sobrevivencia en cada tratamiento, cada 45 días, con la finalidad de seleccionar el/los soporte/s sólido/s y/o líquido/s que mantenga/n viable a la bacteria durante el almacenamiento. Además se evaluó el pH en los doce tratamientos y materia orgánica en los primeros cinco, con el propósito de conocer la estabilidad del biofertilizante durante el almacenamiento. A partir de la concentración bacteriana, se calculó la tasa de crecimiento y de muerte, número y tiempo de generación, y finalmente se calcularon los costos de producción de los mejores tratamientos.

De acuerdo al análisis estadístico, a los 180 días de almacenamiento, el soporte sólido que mantiene mayor concentración bacteriana es t3: Turba con vermiculita, con 5.52×10^8 UFC.g⁻¹. Con respecto al soporte líquido, el tratamiento con mayor población bacteriana es t11: Solución de melaza al 2%, con una concentración de 3.86×10^8 UFC.ml⁻¹. Cabe mencionar que de los doce tratamientos evaluados únicamente en t1: Turba de Chimborazo, no se mantuvo una concentración bacteriana igual o mayor a 1×10^7 UFC.ml⁻¹ o g⁻¹, que es la población adecuada para ser aplicada en campo. Por lo que, otro factor determinante, para la selección del mejor soporte, fue el costo de producción, es así que, se descartó la Turba con vermiculita, a pesar de ser en la que se alcanzó una mayor concentración bacteriana, puesto que, el costo de producción de 30 ml de biofertilizante fue de 2.11 dólares, y se eligió como mejor soporte sólido a las perlas de alginato con un costo de producción de 1.63 dólares y alternativamente a la mezcla (T. Chimborazo + 1% CaCO₃ + 3% raíz maíz) con un costo de producción de 1.65 dólares. Como soporte líquido se seleccionó a la solución de melaza al 2%, con un costo de producción de 1.10 dólares la funda de 30 ml de producto. En cuanto al pH y porcentaje de materia orgánica en los tratamientos seleccionados, no existe un cambio altamente significativo durante el almacenamiento.

CAPITULO I

EL PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN

1.1 Tema de la investigación

EVALUACIÓN DE SOPORTES SÓLIDOS Y LÍQUIDOS, PARA LA PRODUCCIÓN DE UN BIOFERTILIZANTE A BASE DE *Azospirillum* spp. APLICABLE AL CULTIVO DE MAÍZ (*Zea mays* L.)

1.2 Planteamiento del problema

Actualmente, en Ecuador no se han evaluado soportes para la producción de un biofertilizante con cepas nativas de *Azospirillum*, por tal razón, la distribución hacia el agricultor es prácticamente nula, privándole de los beneficios que brinda ésta bacteria como promotora del crecimiento vegetal (Plant Growth Promoting Rhizobacteria PGPR), gracias a la producción de fitohormonas que incrementan el área radicular de la planta, mejorando la absorción de agua y minerales presentes a lo largo de la producción del cultivo (Vande A. *et al.*, 2000). Además el género *Azospirillum* tiene la capacidad de fijar al suelo el nitrógeno que se encuentra en la atmósfera y hacerlo disponible para los cultivos (Labandera C. *et al.*, 2000). Siendo el Nitrógeno uno de los factores, que gobiernan la productividad del cultivo de maíz, el agricultor se ha visto en la necesidad de emplear fertilizantes químicos costosos y altamente contaminantes, por lo que la fijación biológica de nitrógeno constituye una alternativa importante para aumentar la productividad de los cultivos (Milano E., 2007).

El éxito del uso de biofertilizantes, desde el punto de vista agrícola se basa en lograr el establecimiento de una buena asociación bacteria-raíz. Con este fin es imprescindible elaborar una formulación con soportes que garanticen la supervivencia de *Azospirillum* spp. durante el tiempo que transcurre desde que la población bacteriana es producida hasta que se aplica en el campo (Noceti J., 2000). El uso eficiente de esta tecnología brindará una alternativa ecológica a los agricultores logrando incrementar el rendimiento de sus cosechas con un menor costo de producción, mejorando de esta manera su nivel de vida, contribuyendo a la protección del ambiente y el equilibrio del ecosistema.

1.2.1 Contextualización

Frente a la necesidad de producir más alimentos para abastecer la demanda alimenticia, los agricultores requieren usar fertilizantes; pero, en sólo un año enfrentan incrementos en el costo de éstos que oscila entre 30 y 50 por ciento. En 2008, el Banco Mundial reportó que el insumo encabezó la lista de incrementos en el mundo con 27.9 por ciento, respecto al cierre de 2007. México, importador por excelencia de fertilizante, vive hoy las consecuencias de haber desmantelado su industria en este rubro, por otra parte, países como India y China, que tienen miles de millones de habitantes están sembrando y fertilizando cada vez más, con el propósito de abastecer la demanda alimenticia que enfrentan. Además con el petróleo también sube el transporte marino con que se mueve el fertilizante en todo el planeta (Perea E., 2008).

A nivel mundial, según los datos estimados por la Asociación Internacional de Fabricantes de Fertilizantes, IFA, se estima un incremento del consumo del 19% en el horizonte 2012/13 con respecto a 2006/07. No obstante, es previsible que la evolución de la economía mundial influya sobre estas estimaciones (García I., 2008).

Según expertos, la urgencia mundial de enfrentar los problemas ambientales y los efectos del cambio climático, debe ser combinada con la necesidad de producir alimentos para una población en constante crecimiento. La posibilidad de mantener la productividad agrícola está irremediablemente ligada al uso generalizado de fertilizantes biológicos, a modo de tecnología alternativa al abusivo uso de plaguicidas y abonos químicos. Estos últimos, además de ser costosos en los aspectos económico y energético, gravitan negativamente sobre el ambiente y la salud humana y animal (Diario El Universal, 2008).

Por otra parte, el maíz, el trigo y el arroz son los cultivos que más se consumen a nivel mundial. Otras gramíneas como el sorgo y la cebada son aprovechadas para la alimentación y engorde de ganado, o por la industria y al igual que todos los vegetales, estos cultivos requieren nitrógeno, fósforo, potasio, entre otros, para su crecimiento y producción. Así, con el fin de cubrir la demanda de alimentos, en los países desarrollados, principalmente, se les suministra cada vez una mayor cantidad de fertilizantes minerales. No obstante, esta práctica ha tenido costos ecológicos muy altos (Diario El Universal, 2008). Para mejorar el rendimiento del maíz actualmente se usan inoculantes microbianos

o biofertilizantes, a base de bacterias reconocidas por su capacidad de promover el desarrollo de los cultivos y fijar el nitrógeno atmosférico (Peoples y Craswell, 1992).

Así, uno de los retos más importantes para la agricultura es reducir el empleo de fertilizantes nitrogenados y el costo económico, sin que se afecte la productividad del cultivo. Los biofertilizantes representan una alternativa real para alcanzar estos objetivos (Saura G., 2000).

Una de las bacterias promotoras de crecimiento más empleadas a nivel mundial, para la producción de biofertilizantes es *Azospirillum* por su capacidad de producir auxinas, citocininas y giberelinas, el mecanismo analizado con mayor amplitud ha sido la producción de auxinas, especialmente la del ácido indolacético (AIA) que puede modificar el contenido de fitohormonas de las plantas conduciendo a la estimulación del crecimiento de las mismas (Thuler D. *et al.*, 2003). Actualmente, existen en el mercado mundial, inoculantes de *Azospirillum* en soporte de vermiculita, que se venden en Italia y *Azospirillum lipoferum* microgranulado, registrado en Francia (Saura G., 2000).

En Ecuador recientemente se ha importado de Argentina un producto comercial líquido (NoctinAzo) con cepas de *Azospirillum brasilense*, cuya eficiencia en campo aún no se ha verificado, cabe mencionar que se han realizado investigaciones a nivel internacional, en las que no se ha obtenido diferencia significativa de rendimiento con respecto al testigo sin inocular (Méndez M., 2008). El principal obstáculo es que el suelo es heterogéneo y tiene un ambiente imprevisible. Los inoculantes bacterianos tienen que competir con la microflora nativa que está más adaptada a las diferentes condiciones del suelo (Bashan Y., 1998).

En la Serranía Ecuatoriana la mayor parte de la población rural depende del maíz para su seguridad alimentaria, ya que para muchos esta gramínea es la principal fuente de energía. La falta de tecnologías accesibles para los pequeños agricultores maiceros de la sierra, ha acentuado la pobreza del sector rural, provocando que abandonen el campo poniendo en peligro la seguridad alimentaria de ésta región (Yáñez C. *et al.*, 2003). Dicha problemática impulsó al Programa de Maíz del INIAP-EESC, a desarrollar la caracterización y selección de la bacteria diazotrófica *Azospirillum* spp., asociada con el maíz de altura, de donde se obtuvieron nueve cepas de *Azospirillum* spp. caracterizadas

fenotípicamente (Espinoza L., 2004), cuya eficiencia fue evaluada en campo, utilizando como medio transportador la Turba de Chimborazo, en la cual, se evaluó la sobrevivencia de la bacteria por un mes de almacenamiento en condiciones de laboratorio (Yáñez C., *et al.*, 2003), mientras que de acuerdo al SENASA (Servicio Nacional de Sanidad Agraria, Argentina) el tiempo promedio de almacenamiento es de seis meses para soportes de turba (Peticari A., 2006). En la actualidad, la distribución del biofertilizante a base de cepas nativas de *Azospirillum*, no es posible, puesto que, no se han evaluado soportes a nivel nacional que garanticen al agricultor la efectividad de la bacteria al momento de ser inoculada en campo, Además el mercado exige que los inoculantes sean tan baratos como sea posible, el costo de desarrollar un nuevo material inoculante rápidamente mueve el precio fuera del rango de su uso práctico en agricultura, especialmente en países en desarrollo (Díaz A., 2008), por tal motivo es indispensable la evaluación de soportes sólidos y líquidos para la producción de un biofertilizante a base de *Azospirillum* spp. que se encuentre al alcance del productor de maíz de la sierra ecuatoriana.

1.2.2 Análisis crítico

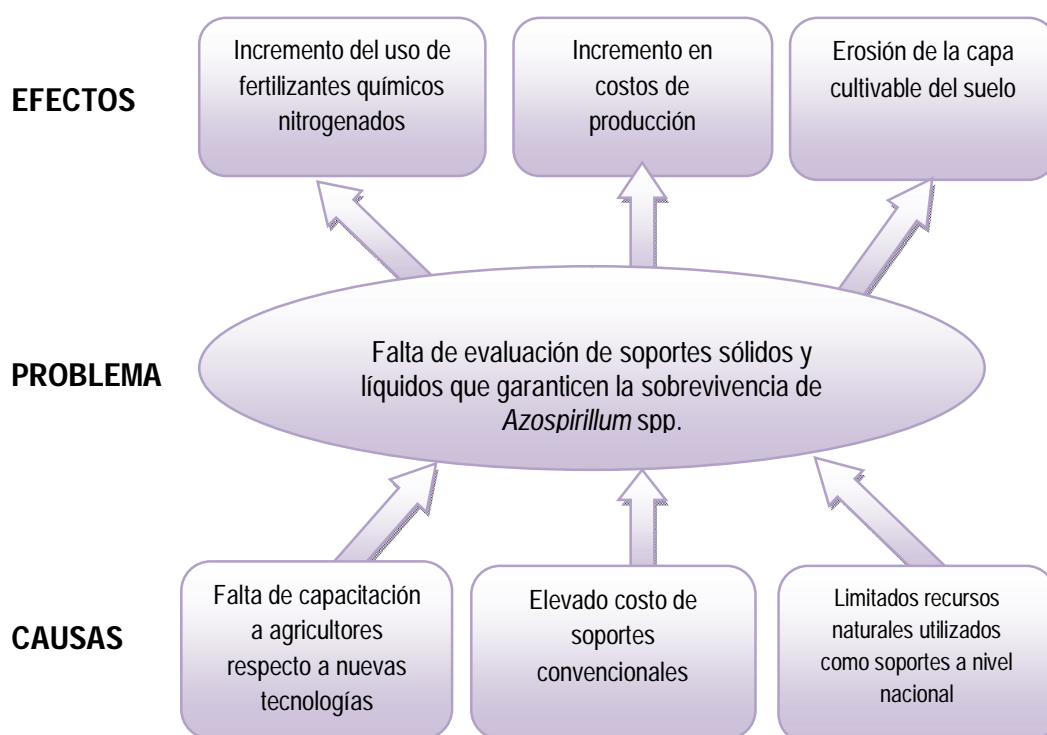


Figura N.1. Árbol del Problema (Relación Causa-Efecto)

Elaborado por: Yolanda Pallo

Relación causa – efecto

Para poder implementar, una agricultura sostenible, es necesario hallar una solución, que evite el uso indiscriminado de fertilizantes de síntesis química. En este contexto, se pretende desarrollar un inoculante de calidad que garantice el número de células viables hasta el momento de su aplicación. Así, la evaluación de soportes sólidos y líquidos nos permitirá seleccionar el mejor tratamiento para la producción de un biofertilizante a base de la cepa C2-Bolívar de *Azospirillum* spp.

1.2.3 Prognosis

Azospirillum presenta un gran potencial como biofertilizante, se ha descrito que la inoculación con esta bacteria en algunas gramíneas de interés alimenticio provoca un incremento en la producción de granos, puesto que, a más de fijar nitrógeno atmosférico, *Azospirillum* produce auxinas, sustancias promotoras del crecimiento vegetal, como el ácido Indol Acético (IAA), el cual induce la deformación y el aumento radicular, logrando una mayor captación de nutrimentos por parte de la planta. En caso de no realizarse la evaluación de soportes sólidos y líquidos, se privaría al agricultor de los beneficios que brinda éste microorganismo, al no contar con un soporte adecuado para transportar y mantener viable a la bacteria hasta el momento de su aplicación, por tal razón, la distribución del biofertilizante al agricultor, sería limitada, puesto que, no se podría garantizar la efectividad de la bacteria, al no conocerse el tiempo de viabilidad del producto, es decir, cuánto tiempo se mantiene con una concentración entre 1×10^7 UFC ml⁻¹ y 1×10^9 UFC ml⁻¹. En tales circunstancias no se lograría brindar al agricultor un producto confiable que incremente el rendimiento de sus cosechas y que minimice el uso de fertilizantes químicos, incrementando así el costo de producción y el impacto ambiental negativo, conociendo que un factor limitante para la producción del maíz es la escasez de nitrógeno en el suelo y para solucionar este inconveniente normalmente se aplica urea (Yáñez C., 2007) que en caso de no tener un manejo adecuado, se obtiene como consecuencia pérdidas de nitrógeno, principalmente en forma de NO₃ y NH₄ por lixiviación y volatilización respectivamente, también producidas por desnitrificación (N₂O, NO), que fuera del sistema suelo-planta, pueden causar daños al hombre, los peces, los animales domésticos y en general al ambiente (Urquiaga y Zapata, 2000).

1.2.4 Formulación del problema

¿Cuál de los soportes sólidos y/o líquidos evaluados permitirá/an mantener viable a la bacteria durante seis meses de almacenamiento para así desarrollar un biofertilizante a base de cepas nativas de *Azospirillum* spp. aplicable al cultivo de maíz?

1.2.5 Preguntas directrices

- ¿Cuál es el comportamiento de la cepa C2 Bolívar de *Azospirillum* spp. en seis soportes sólidos y seis líquidos durante seis meses?
- ¿Cuál de los soportes sólidos y/o líquidos garantiza la sobrevivencia de *Azospirillum* spp. por un lapso de seis meses?
- ¿Cuál es el costo de producción del biofertilizante?

1.2.6 Delimitación del objeto de investigación

Área:	Agricultura sustentable
Sub-área:	Microbiología de suelos.
Sector:	Medioambiental
Sub-sector:	Soportes para producción de Biofertilizantes
Situación geográfica:	Planta Piloto para la producción del biofertilizante, del Programa de Maíz de la EESC del INIAP, ubicada en la parroquia Cutuglahua, cantón Mejía, provincia de Pichincha.
Situación temporal:	Mayo 2010 – Diciembre 2010

1.3 Justificación

Definida la importancia fundamental del maíz, como cultivo imprescindible dentro de todo esquema de producción agrosustentable, la incorporación de tecnología para mejorar el manejo de este cultivo, se vincula a un beneficio económico, social y ambiental. Existen microorganismos capaces de influenciar positivamente la producción de varios cultivos, la bacteria *Azospirillum* spp. contribuye a la asimilación del nitrógeno libre y estimula el crecimiento de cereales y gramíneas. En estudios anteriores realizados por el Programa

de Maíz del INIAP - EESC se confirma que el uso de *Azospirillum* spp. como biofertilizante logra un incremento significativo en el rendimiento.

Para la incorporación de esta bacteria al cultivo es necesario un medio transportador que le brinde protección y las condiciones necesarias para mantenerla viable hasta el momento de su aplicación. Actualmente, existe escasa información en cuanto a soportes aptos para mantener la sobrevivencia de *Azospirillum* por un periodo de seis meses, principalmente tomando en cuenta que a pesar de pertenecer al mismo género de bacterias utilizadas en estudios internacionales, cada una se ha adaptado a las condiciones de vida del lugar a partir del cual fue aislada, por lo tanto resulta importante la evaluación de soportes sólidos y líquidos, para la producción de esta bacteria como biofertilizante para el cultivo de maíz en la sierra del Ecuador.

El presente estudio pretende ofrecer alternativas tecnológicas respecto a los soportes sólidos y/o líquidos que garanticen la adecuada sobrevivencia de *Azospirillum* spp. lo cual podrá permitir su mejor aplicación en maíz en condiciones de campo. El manejo convencional de fertilizantes de síntesis química ha venido acarreado un sinnúmero de impactos ambientales negativos a más de representar gastos de ingentes cantidades de dinero causan un crónico deterioro del suelo. Es por ello que se busca implantar nuevas tecnologías amigables con el ambiente, las cuales brinden soluciones eficientes y viables a los problemas antes mencionados, adicionalmente representan una opción para la optimización de recursos naturales, puesto que los materiales empleados como soportes, son inofensivos y compatibles con el medio ambiente.

El disponer de una alternativa biológica de fertilización brindará a los agricultores la posibilidad de incrementar rendimientos y disminuir costos de producción, mejorando los niveles de vida y adecuada protección del ambiente.

1.4 Objetivos

1.4.1 General

- Evaluar técnica y económicamente soportes sólidos y líquidos, para la producción de un biofertilizante a base de *Azospirillum* spp. aplicable al cultivo de maíz.

1.4.2 Específicos

- Evaluar durante un período de seis meses de almacenamiento la sobrevivencia de la cepa C2 Bolívar de *Azospirillum* spp. en seis soportes sólidos y seis líquidos.
- Elaborar curvas de crecimiento de la cepa C2-Bolívar de *Azospirillum* spp. en los diferentes soportes sólidos y líquidos durante seis meses de almacenamiento.
- Seleccionar el(los) soporte(s) más eficiente(s) que garantice(n) la sobrevivencia de *Azospirillum* spp.
- Obtener costos de producción de los mejores tratamientos.

CAPITULO II

MARCO TEÓRICO

2.1 Antecedentes Investigativos

Durante los últimos años, la biotecnología ha mejorado las condiciones para desarrollar diferentes cultivos, entre ellos el de maíz. La aplicación de bacterias promotoras del desarrollo vegetal (PGPRs), como *Pseudomonas*, *Azospirillum* y otras, han producido un incremento del rendimiento de los cultivos (Ferlini y Díaz, 2006).

Por lo que es necesario desarrollar un biofertilizante a base de cepas nativas de *Azospirillum* spp. que al inocularlo, vivan sobre las raíces de ciertas plantas provocando cambios morfológicos y fisiológicos, debido al ácido indol acético producido por esta bacteria que modifica el contenido de fitohormonas, provocando el aumento en la captación de agua y minerales (Burdman *et al.*, 2000), lo cual, sumado a la fijación biológica de nitrógeno atmosférico, promuevan el crecimiento y rendimiento de los cultivos (Galal Y. *et al.*, 2000).

Considerando la importancia de ésta bacteria, el Programa de Maíz de la Estación Experimental Santa Catalina del Instituto Nacional Autónomo de Investigaciones Agropecuarias, realizó una recolección y caracterización de cepas de la bacteria *Azospirillum* spp. que fueron aisladas a partir de la rizósfera y raíces de plantas de maíz de varias provincias del Ecuador, obteniéndose nueve cepas identificadas fenotípicamente (Espinoza L., 2004). Para la evaluación se inocularon las cepas en diferentes variedades de maíz en invernadero y campo, obteniéndose como resultado la no especificidad de las mismas y una buena adaptabilidad en el cultivo de maíz (Yáñez C. *et al.*, 2004). En el 2006 se continuó con la evaluación en la provincia de Chimborazo, Cantón Alausí, se determinó que al inocular los cultivos con la cepa proveniente de Bolívar se alcanza un rendimiento promedio de 3371,05 kg/ha mientras que en el testigo, sin inocular, se alcanzó un rendimiento de 2121.6 kg/ha. Por otra parte, al aplicar el fertilizante químico al 50% en asociación con la cepa procedente de Bolívar en la variedad de maíz INIAP-102, incrementó el rendimiento de 4000 kg/ha (con 100% fertilización química) a 4167.4 kg/ha, desde el punto de vista económico, esta aplicación tiene una tasa beneficio/costo de 2.67, que es la alternativa más rentable para la producción del cultivo de maíz (Molina S., 2006),

por tales razones en la presente investigación se empleará la cepa de *Azospirillum* spp. procedente de la provincia de Bolívar.

El éxito del uso de biofertilizantes, desde el punto de vista agrícola se basa en lograr el establecimiento de una buena asociación bacteria-raíz. Con este fin es imprescindible elaborar una formulación con soportes que garanticen la supervivencia de los microorganismos durante el tiempo que transcurre desde que la población bacteriana es producida hasta que se aplica en el campo (Noceti J., 2000).

Los soportes son materiales portadores que brindan protección y los requerimientos necesarios a la bacteria (Milián y Labandera, 2001), por lo cual debe cumplir características físicas y químicas, como la esterilidad, uniformidad del material, retención de agua y compatibilidad según la especie microbiana. Se conocen diferentes tipos de soportes: suelos como turba, suelo inorgánico, compost, aceites vegetales, vermiculita, roca fosfórica, perlas de alginato y los liofilizados (Bashan Y., 1998).

En cuanto al número mínimo de células necesario en un inoculante, varía en todo el mundo, así, Okon y Gonzales, 1994, analizaron datos obtenidos durante los últimos veinte años sobre inoculación con *Azospirillum* spp., donde se demostraron incrementos del 5 al 30% en rendimiento en producción del cultivo en aquellos experimentos donde se utilizó el inoculante en una concentración óptima de células en un rango de 1×10^7 a 1×10^8 UFC.g⁻¹.

Según la Resolución N° 310/1994 del SENASA, citado por Peticari, 2006, los inoculantes deben contener no menos de 1×10^9 células por g o ml de producto a la fecha de elaboración y no menos de 1×10^8 por g o ml a la fecha de vencimiento. El tiempo de vigencia del producto a partir de su elaboración, según lo registrado en SENASA, depende de su composición, así, los inoculantes de turba y dolomita tienen una vida útil de 6 meses, los líquidos acuosos, de 6 a 18 meses y los líquidos oleosos, 3 meses.

En países como Colombia, la legislación es más flexible en cuanto a concentración de microorganismos, exigiendo mínimo 1×10^5 UFC.g⁻¹ de inoculante (ICA, 2006).

En lo referente al soporte de *Azospirillum* spp. para la inoculación se ha probado que la turba importada de Minnesota (E.E.U.U.) funciona como el mejor medio portador, al incrementar el número de unidades formadoras de colonias (UFC) de 1×10^7 ml⁻¹ a

$2.67 \times 10^7 \text{ ml}^{-1}$ en un mes de almacenamiento, mientras que en la turba proveniente de Chimborazo redujo la concentración de UFC.g⁻¹ de 1×10^7 a 2.01×10^6 (Yáñez *et al.*, 2004). Cabe mencionar que la importación de la turba de Minnesota conlleva un elevado costo de producción, por lo que se pretende utilizar materiales de fácil disponibilidad dentro del país.

La evaluación de la sobrevivencia de *Azospirillum* en diferentes soportes sólidos y líquidos tiene la finalidad de aportar al proyecto de producción y validación de un biofertilizante a base de cepas de *Azospirillum* spp.

2.1.1 Fundamentación Teórico Científica.

2.1.1.1 Biofertilizantes

El uso de fertilizantes químicos y agroquímicos es cada día más notorio con el crecimiento de la población. Esto trae como consecuencia la erosión de los suelos y la disminución del rendimiento de los mismos. Por lo tanto, es claro que, para mejorar la calidad de los cultivos debemos hacer uso de nuevas tecnologías, como la aplicación de biofertilizantes (Noceti J., 2000).

Un biofertilizante es un producto que ofrece al medio de cultivo (suelo, sustrato, etc) una población de microorganismos capaces de enriquecer dicho medio con elementos fertilizantes en una forma química, que permiten ser utilizados por las plantas. El éxito de estos procesos, desde el punto de vista agrícola se basa en lograr el establecimiento de una buena asociación bacteria- raíz de la planta (Noceti J., 2000).

Según Cuevas *et al.*, 2000, los biofertilizantes o abonos biológicos tienen como principio activo microorganismos vivos (bacterias y/u Hongos) que promueven y benefician la nutrición y el crecimiento de las plantas. Desde el punto de vista de una agricultura sostenible, el uso de biofertilizantes representa una importante alternativa para limitar el uso de abonos químicos, reduciendo su negativo impacto ambiental y económico, mejorando la productividad de los cultivos enfocado al óptimo crecimiento vegetal, permitiendo así un mayor aprovechamiento de los recursos naturales del suelo.

2.1.1.2 Soportes empleados para biofertilizantes

Según Fernández, 1995, citado por Villaverde M. *et al.*, 2006, la forma física de un biofertilizante es un factor determinante en el resultado práctico del producto elaborado y puede variar, siempre que sea compatible con las prácticas agrícolas, incorporándose fácilmente a las operaciones de rutina. En el producto, los microorganismos deben permanecer viables, en estado latente o metabólicamente activos.

Los soportes son materiales portadores que brindan protección y los requerimientos necesarios a la bacteria (Milián y Labandera, 2001), por lo cual debe cumplir características físicas y químicas, como la esterilidad, uniformidad del material, retención de agua y compatibilidad según la especie microbiana. Se conocen diferentes tipos de soportes: suelos como turba, suelo inorgánico, compost, aceites vegetales, vermiculita, roca fosfórica, perlas de alginato y los liofilizados (Bashan Y., 1998).

Según Stephens *et al.*, 2000, uno de los grandes retos para la producción a gran escala de biofertilizantes ha sido encontrar un soporte que cumpla las siguientes características:

- Que sea fácilmente disponible, teniendo una composición uniforme y con un precio asequible.
- Que no sea tóxico para la bacteria.
- Con alta capacidad de retención de agua.
- De fácil esterilización.
- Que se pueda corregir fácilmente su pH.
- Que favorezca el crecimiento inicial de la bacteria utilizada.
- Que mantenga un alto número de células hasta su uso.

Estudios sobre el uso de diferentes vehículos para bacterias, han demostrado que al comparar la viabilidad de *Azospirillum* en diferentes soportes, la turba superó a la vermiculita, el polvo de talco, los gránulos de basalto y la bentonina (Fallik E. *et al.*, 1996). Los problemas de la turba son: baja disponibilidad en algunos países, además de estar en

algunos casos en reservas naturales, el método de almacenamiento es la refrigeración, lo que ocasiona que su conservación sea más costosa, su composición no es constante, lo que hace difícil mantener su calidad; por ser un recurso no renovable, es cada vez más difícil de hallarlo. Otro soporte con gran potencial son los biopolímeros, donde se han encontrado buenos resultados a nivel de laboratorio, con el gran problema de la escasa información en la literatura, por causa de ser desarrollados bajo patentes (Bashan Y. *et al.*, 1997).

Las técnicas de inmovilización celular, ofrecen potenciar los efectos de los microorganismos sin crear problemas de contaminación. Una técnica que ha sido utilizada con éxito es la inmovilización por atrapamiento en geles como agar, K-carragenina y alginato. Sin embargo, ésta técnica de inmovilización tiene una desventaja fundamental para la agricultura su elevado costo, tanto de materia prima como del proceso industrial. Otra técnica muy utilizada en la práctica es la adsorción, empleando como soporte la arcilla, vermiculita, perlita, sepiolita, caolín, tierra de diatomeas y zeolita natural (Villaverde M. *et al.*, 2006).

Cuando se va a comercializar un biofertilizante es vital que el número de células viables, aplicado a la planta sea el correcto para la promoción del crecimiento (Boddey y Dobereiner, 1988). Si bien puede haber un umbral del número de bacterias que deben ser inoculados en una determinada planta, excesivas cantidades de bacterias puede ser perjudicial para la germinación y el crecimiento de las semillas o de las plantas (Chanway C., 1997).

2.1.1.3 Nutrición microbiana

Las células contienen grandes cantidades de pequeñas moléculas, así como de macromoléculas. La célula puede obtener la mayoría de las pequeñas moléculas que necesita del exterior o sintetizarlas a partir de moléculas más simples. Las macromoléculas, por el contrario, son siempre sintetizadas en la célula. Aunque hay muchos elementos en la naturaleza, prácticamente la totalidad de la masa celular, está formada por sustancias con cuatro tipos de átomos: carbono, oxígeno, hidrógeno y nitrógeno. Estos cuatro elementos constituyen el esqueleto de las macromoléculas, así como las moléculas orgánicas pequeñas. Otros elementos son menos abundantes que el

C, O, H y N, pero son igualmente importantes para el conjunto del metabolismo. Éstos incluyen el fósforo, potasio, calcio, magnesio, azufre, hierro, zinc, manganeso, cobre molibdeno, cobalto y otros pocos elementos dependiendo del microorganismo (Madigan *et al.*, 2001).

2.1.1.3.1 Macronutrientes

La mayoría de los procariotas requieren un compuesto orgánico de algún tipo como fuente de carbono. Una gran cantidad de compuestos tales como, aminoácidos, ácidos grasos y compuestos aromáticos pueden ser utilizados por una bacteria. En peso seco una célula normal consta aproximadamente de 50% de carbono, 12% de nitrógeno, el cual se encuentra en la naturaleza tanto en forma orgánica como inorgánica. Sin embargo, la globalidad del nitrógeno utilizable está en forma inorgánica, bien como amoníaco (NH_4), nitrato (NH_3) o nitrógeno molecular (N_2), este último únicamente puede ser utilizado por un reducido grupo de bacterias, llamadas fijadoras de nitrógeno (Madigan *et al.*, 2001).

El fósforo acontece en la naturaleza en forma de fosfatos orgánicos o inorgánicos y es requerido por la célula para la síntesis de ácidos nucleicos y fosfolípidos. El azufre, es fundamental por ser un elemento estructural en los aminoácidos cisteína y metionina y porque está presente en ciertas vitaminas, así como en la coenzima A. La mayoría del Azufre celular procede de fuentes inorgánicas, ya sean sulfatos o sulfuros. El potasio es necesario en todos los organismos. Una gran cantidad de enzimas lo requieren, específicamente para la síntesis de proteínas. El magnesio estabiliza los ribosomas, las membranas celulares, los ácidos nucleicos y se requiere también para la actividad de varias enzimas. El calcio (no es esencial para el crecimiento de muchos microorganismos), ayuda a estabilizar la pared celular bacteriana y genera termoresistencia en endosporas bacterianas. El sodio es requerido por algunos microorganismos de acuerdo a la naturaleza química de su hábitat. Aunque al hierro se lo considera como micronutriente, éste es requerido por la célula en mayores cantidades que los elementos traza y juega un papel muy importante en la respiración celular, siendo un componente clave de los citocromos, y de las proteínas que contienen hierro y azufre implicadas en el transporte de electrones, además, forma parte de las catalasas, peroxidasas, oxigenasas y todas las nitrogenasas. Debido a que la mayor parte de las sales inorgánicas son altamente insolubles, muchos microorganismos producen agentes

que unen hierro de una forma muy específica, denominados sideróforos, que solubilizan las sales de hierro transportándolo al interior celular (Madigan *et al.*, 2001).

2.1.1.3.2 Micronutrientes (elementos traza)

Aunque los micronutrientes son requeridos en muy pequeñas cantidades son, sin embargo, tan importantes como los macronutrientes para la función celular. Los micronutrientes son metales, muchos de los cuales forman parte de enzimas que son catalizadores celulares. Debido a que el requerimiento de elementos traza es muy pequeño, para el cultivo de microorganismos en el laboratorio, resulta innecesaria su adición al medio.

Entre los micronutrientes tenemos: cromo, cobalto, cobre, manganeso, molibdeno, níquel, selenio, tungsteno, vanadio y zinc. No todos los micronutrientes indicados son requeridos por todas las células, algunos se encuentran sólo en microorganismos muy específicos (Madigan *et al.*, 2000).

2.1.1.4 Crecimiento bacteriano

El crecimiento se define como el aumento del número de bacterias en una población determinada. Es importante diferenciar entre el crecimiento de una célula individual y el de una población. Dicho crecimiento celular es el resultado del aumento del tamaño de la célula, seguido de su división. El crecimiento de una población, en cambio, es el resultado del aumento del número total de células, que puede ser cuantificado directamente (contando el número de células) o indirectamente (por ejemplo, midiendo la masa celular) (Varela y Grotiuz, 2002).

La fisión binaria y otros procesos de división celular causan un aumento en el número de células de una población. El crecimiento poblacional es estudiado mediante el análisis de la curva de crecimiento de un cultivo microbiano. Cuando se cultivan microorganismos en un cultivo discontinuo o sistema cerrado (sin entrada ni salida de los componentes del sistema), las concentraciones de nutrientes disminuyen progresivamente, mientras que las concentraciones de residuos aumentan, el crecimiento microbiano puede representarse gráficamente como el logaritmo de número de células viables frente al tiempo, dicha curva presenta cuatro fases:

2.1.1.4.1 Fase de latencia

En esta fase no existe un incremento neto de masa, la célula está sintetizando nuevos componentes, la duración de la fase de latencia varía considerablemente dependiendo del estado de los microorganismos y de la naturaleza del medio. La inoculación en un medio químicamente diferente da lugar a una fase de latencia larga. Por otro lado, la fase de latencia será corta, e incluso inexistente, cuando se transfiere un cultivo joven, en fase exponencial a un medio fresco (Willey J. *et al.*, 2008).

2.1.1.4.2 Fase exponencial

Durante la fase exponencial o logarítmica, los microorganismos crecen y se dividen a la velocidad máxima posible que les permite su potencial genético, la naturaleza del medio y las condiciones de cultivo (Willey J. *et al.*, 2008). Cuando el cultivo alcanza una velocidad constante de crecimiento el número de células se expresa como función de 2^g , donde g es el número de generaciones que ha ocurrido durante el período de fase exponencial (Carrillo L., 2003).

2.1.1.4.3 Fase estacionaria

En un sistema cerrado, llega un momento en que el crecimiento de la población se detiene y la curva de crecimiento se hace horizontal, el número total de células viables permanece constante. Esto puede ser debido a un equilibrio entre división y muerte celular; otra posibilidad es que la población permanece metabólicamente activa, pero simplemente ha cesado de dividirse (Willey J. *et al.*, 2008).

2.1.1.4.4 Fase de senescencia y muerte

Durante muchos años, la disminución del número de células viables que sigue la fase estacionaria, era descrita simplemente como fase de muerte. Se asumía que los cambios ambientales perjudiciales como la privación de nutrientes y la acumulación de desechos tóxicos causaban daños irreparables que daban lugar a la pérdida de viabilidad. Es decir, aunque las células bacterianas fueran transferidas a un medio fresco, no se observaba ningún crecimiento celular. Actualmente ese punto de vista es puesto en duda, ya que se cree que la fase de muerte, no significa que las células hayan perdido irreversiblemente su capacidad de reproducirse, únicamente, los microbios son

temporalmente incapaces de crecer bajo esas condiciones. Algunas bacterias forman esporas como mecanismo de supervivencia. Otras podrían inactivarse sin sufrir cambios en su morfología y una vez que disponen de condiciones apropiadas los microorganismos viables pero no cultivables (VBNC) reanudan su crecimiento. La segunda alternativa a una simple fase de muerte, es la muerte celular programada, donde se propone que una fracción de la población microbiana está genéticamente programada para suicidarse, y así, los nutrientes que estas células dejan escapar hacen posible el crecimiento de aquellas células de la población que no han iniciado el suicidio. Por tanto, las células moribundas son altruistas, es decir, se sacrifican en beneficio de la población. Esta disminución puede durar meses o años. Durante este tiempo, la población bacteriana se encuentra en evolución continua. (Willey J. *et al.*, 2008).

2.1.1.5 El género *Azospirillum*

Azospirillum es un género de proteobacterias gram negativas, de vida libre que taxonómicamente pertenecen a la familia Azotobacteraceae (Mortimer *et al.*, 1981). En el año 1978, se propone la creación del género *Azospirillum* y actualmente son reconocidas seis especies. Las dos primeras en ser descritas y las más estudiadas son *A. lipoferum* y *A. brasilense*. Posteriormente fueron descritas las especies *A. amazonense*, *A. halopraeferans*, *A. irakense* y *A. largimobile*. Pocos años antes ésta especie fue considerada como un sinónimo de la especie *A. lipoferum*, pero recientemente, en honor de quien impulsara los estudios con este género bacteriano y descubriera otros diazótrofos, se ha propuesto la especie candidata *A. doebereineriae* (Caballero J., 2001).

Azospirillum no solo fija nitrógeno, produce además auxinas, sustancias promotoras del crecimiento vegetal, como el ácido indol acético (IAA), el cual induce la deformación y el aumento de pelos radiculares, logrando en la planta una mayor absorción de nutrientes. Otra auxina que se ha relacionado con *Azospirillum brasilense* es el ácido indol butírico (IBA) encontrado en plántulas de maíz inoculadas con este microorganismo. Otros posibles mecanismos que benefician el crecimiento de las plantas son la producción de sideróforos, activación de mecanismos de mineralización y solubilización, por producción de antibióticos y por inducción de la expresión de factores de resistencia por las plantas (Novo R., 2002).

Debido a todas estas características *Azospirillum* es considerada como una rizobacteria promotora del crecimiento vegetal (Plant Growth Promoting Rhizobacteria, PGPR).

Esta bacteria es móvil debido a la presencia de un flagelo polar y varios laterales, habilitándola para moverse en medios líquidos y gelificados, desplazándose in vitro hacia compuestos que se encuentran en los exudados radicales, y posibilitando la adsorción del microorganismo a la superficie de la raíz (Baca B., 2002).

Las especies de *Azospirillum* son habitantes regulares del ambiente externo de las raíces (rizósfera) y de las hojas (phyllosphere) existiendo como flora epífita no patógena. Algunas especies existen en grandes cantidades en la rizósfera de las plantas superiores, en crecimiento asociativo con estas, beneficiándolas con el nitrógeno fijado (Mortimer P. et al., 1981).

Azospirillum muestra una amplia distribución geográfica alrededor del mundo. Son más abundantes en las regiones tropicales, pero también se les encuentra en las regiones templadas, frías y desérticas. El pH del suelo juega un papel importante en la presencia del género *Azospirillum*. Las especies de *A. brasilense* y *A. lipoferum* se encuentran en mayor abundancia en suelos con valores de pH cercanos a la neutralidad. A pH bajo 5 se les encuentra en forma esporádica, y su aislamiento no se logra de suelos con pH menor a 4.5. Algunos factores abióticos tales como porcentaje de arcilla, contenido de materia orgánica, capacidad de retención de agua y contenido de nitrógeno influyen positivamente la sobrevivencia de *A. brasilense*, en tanto que el tamaño de las partículas de arena y especialmente la alta concentración de carbonato de calcio afectan la sobrevivencia de esta especie en ausencia de plantas (Caballero J., 2001).

2.1.1.5.1 Aislamiento

El aislamiento de la bacteria *Azospirillum* resulta en lo general muy simple, ya sea a partir de suelo rizosférico o de la superficie de las raíces (rizoplano) de numerosas plantas hospederas. También se le aísla del interior de las raíces o tallos de algunas plantas (Caballero J., 1998). El medio de cultivo usado para el aislamiento de las especies de *Azospirillum* es el NFB (nitrogen fixation biological) semigelificado, libre de nitrógeno y con malato como fuente de carbono. En este medio de cultivo son aisladas

predominantemente cepas de las especies *A. lipoferum* y *A. brasilense*. El medio NFB con algunas modificaciones en su composición y pH permiten el aislamiento predominante de otras especies de *Azospirillum*. Estos medios modificados son usados frecuentemente para evaluar la actividad reductora de acetileno, como indicativo de la fijación de nitrógeno (Caballero J., 1998). En tubos, el crecimiento bacteriano en forma de sombrilla, transformado en una película blanca y densa a 2-3 mm por debajo de la superficie del medio de cultivo y el cambio de color del indicador azul de bromotimol son considerados tentativamente como positivos para el aislamiento de la bacteria.

El cultivo puro se logra en diferentes medios de laboratorio, siendo muy usado un medio adicionado del colorante rojo congo, en el cual *A. lipoferum* y *A. brasilense* toman un color rojo escarlata que permite la diferenciación de otros géneros bacterianos.

2.1.1.5.2 Bioquímica de la bacteria

Diversas condiciones tales como el envejecimiento celular y la presencia de metales pesados provocan que las células vibroides de *Azospirillum* cambien su morfología y tomen la forma de "quistes" (conocidos como formas C), formando grumos visibles de gran tamaño. Aparentemente, residuos de arabinosa presentes en el exopolisacárido y en el polisacárido capsular están involucrados en la agregación de *A. brasilense*. La agregación y la formación de quistes mejoran la sobrevivencia de *Azospirillum*, situación en la que la acumulación de poli- β -hidroxibutirato (PHB) parece desempeñar una función importante al servir como almacén de carbono y energía. Además, diversas funciones fisiológicas son atribuidas al PHB, destacándose la mayor resistencia a la desecación, a la luz ultravioleta y al choque osmótico. Se ha sugerido que la formación de quistes pudiera desempeñar una función importante en la sobrevivencia de *Azospirillum* en el ambiente rizosférico, cuando los nutrientes son limitados, previo a la asociación con las raíces de la planta (Caballero J., 2001).

En cultivos de *Azospirillum*, además de AIA se han encontrado otros compuestos indólicos y metabolitos relacionados tales como el ácido indol pirúvico, indol láctico, indol acetamida, indol acetaldehído, indol etanol e indol metanol, triptamina, antranilato y otros compuestos indólicos no identificados. En diferentes estudios se ha tratado de obtener mutantes incapaces de sintetizar AIA, sin embargo, en el mejor de los casos solamente se

logró obtener mutantes hipoproducidas de este compuesto. Esto sugirió la existencia de más de una vía biosintética del AIA en *Azospirillum*. Actualmente se conoce que *Azospirillum* puede sintetizar AIA a través de tres vías. En tanto que las vías del ácido indol pirúvico y la del indol acetamida son dependientes del triptofano, la tercera es una vía independiente de este aminoácido, desconociéndose el precursor del AIA. Resultados recientes permiten sugerir que la indol piruvato descarboxilasa es una enzima común tanto a la vía del indol pirúvico como a la vía no dependiente de triptofano (Caballero J., 2001).

2.2 Fundamentación Filosófica

La presente investigación está orientada con el paradigma positivista donde el Investigador es quien determina un objeto de investigación, partiendo de un marco teórico establecido razonablemente; para estudiar el objeto introduce variables e indicadores; se plantea una hipótesis desde la lógica formal y selecciona métodos, técnicas y procedimientos estandarizados, normados, válidos y confiables, respetando el orden y rigor en su aplicación para evitar toda dificultad o contradicción con lo planificado. A partir de ese momento, toda la labor investigativa está encaminada a la comprobación de la hipótesis. Para ello utiliza el procesamiento estadístico para el análisis objetivo y riguroso de los datos, valorando de esta manera la posibilidad de generalizar los resultados. Evita por todos los medios los errores que pudieran producirse por las preferencias subjetivas e inclinaciones personales del investigador.

La lógica de este paradigma es la aplicación sucesiva de las siguientes etapas: planificación, ejecución, evaluación y comunicación.

Debe tenerse en cuenta que la investigación es un proceso continuo, coherente, fluido, que se divide en etapas para la mejor comprensión y orientación del investigador, pero que no existe una barrera entre dichas etapas.

La planificación es la actividad inicial, donde el investigador proyecta todo lo que va a realizar, y en qué momento lo hará; es decir que esto se materializa en el proyecto o diseño de la investigación.

La ejecución es la etapa donde se llevan a cabo las tareas investigativas planificadas en la fase anterior; en ella se aplican los instrumentos investigativos a las

muestras seleccionadas, con el objetivo de recoger la información, libres del factor subjetivo del hombre.

La evaluación es la fase siguiente, donde se procesan estadísticamente los datos obtenidos en la etapa anterior, lo que permite arribar a conclusiones científicamente fundamentadas.

Como conclusión de este proceso está la fase de comunicación, que constituye la elaboración y divulgación de un detallado informe con los resultados obtenidos. Esto permitirá que otros investigadores puedan repetir la investigación y obtener idénticos resultados, lo que sería una prueba irrefutable del rigor científico con que se ha trabajado y de la autenticidad de los conocimientos producidos (Meza L., 2010).

2.3 Fundamentación Legal

La presente investigación se encuentra relacionada con los siguientes artículos de la Constitución de la República del Ecuador:

Capítulo segundo/Derechos del buen vivir/Sección primera/Agua y alimentación

Art. 13.- Las personas y colectividades tienen derecho al acceso seguro y permanente a alimentos sanos, suficientes y nutritivos; preferentemente producidos a nivel local y en correspondencia con sus diversas identidades y tradiciones culturales. El Estado ecuatoriano promoverá la soberanía alimentaria.

Sección segunda/Ambiente sano

Art. 14.- Se reconoce el derecho de la población a vivir en un ambiente sano y ecológicamente equilibrado, que garantice la sostenibilidad y el buen vivir, *sumak kawsay*.

Se declara de interés público la preservación del ambiente, la conservación de los ecosistemas, la biodiversidad y la integridad del patrimonio genético del país, la prevención del daño ambiental y la recuperación de los espacios naturales degradados.

Art. 15.- El Estado promoverá, en el sector público y privado, el uso de tecnologías ambientalmente limpias y de energías alternativas no contaminantes y de bajo impacto. La soberanía energética no se alcanzará en detrimento de la soberanía alimentaria, ni afectará el derecho al agua.

Capítulo segundo/Biodiversidad y recursos naturales/Sección quinta/Suelo

Art. 409.- Es de interés público y prioridad nacional la conservación del suelo, en especial su capa fértil. Se establecerá un marco normativo para su protección y uso sustentable que prevenga su degradación, en particular la provocada por la contaminación, la desertificación y la erosión.

Art. 410.- El Estado brindará a los agricultores y a las comunidades rurales apoyo para la conservación y restauración de los suelos, así como para el desarrollo de prácticas agrícolas que los protejan y promuevan la soberanía alimentaria.

Sección séptima/Biosfera, ecología urbana y energías alternativas

Art. 413.- El Estado promoverá la eficiencia energética, el desarrollo y uso de prácticas y tecnologías ambientalmente limpias y sanas, así como de energías renovables, diversificadas, de bajo impacto y que no pongan en riesgo la soberanía alimentaria, el equilibrio ecológico de los ecosistemas ni el derecho al agua.

2.4 Categorías Fundamentales

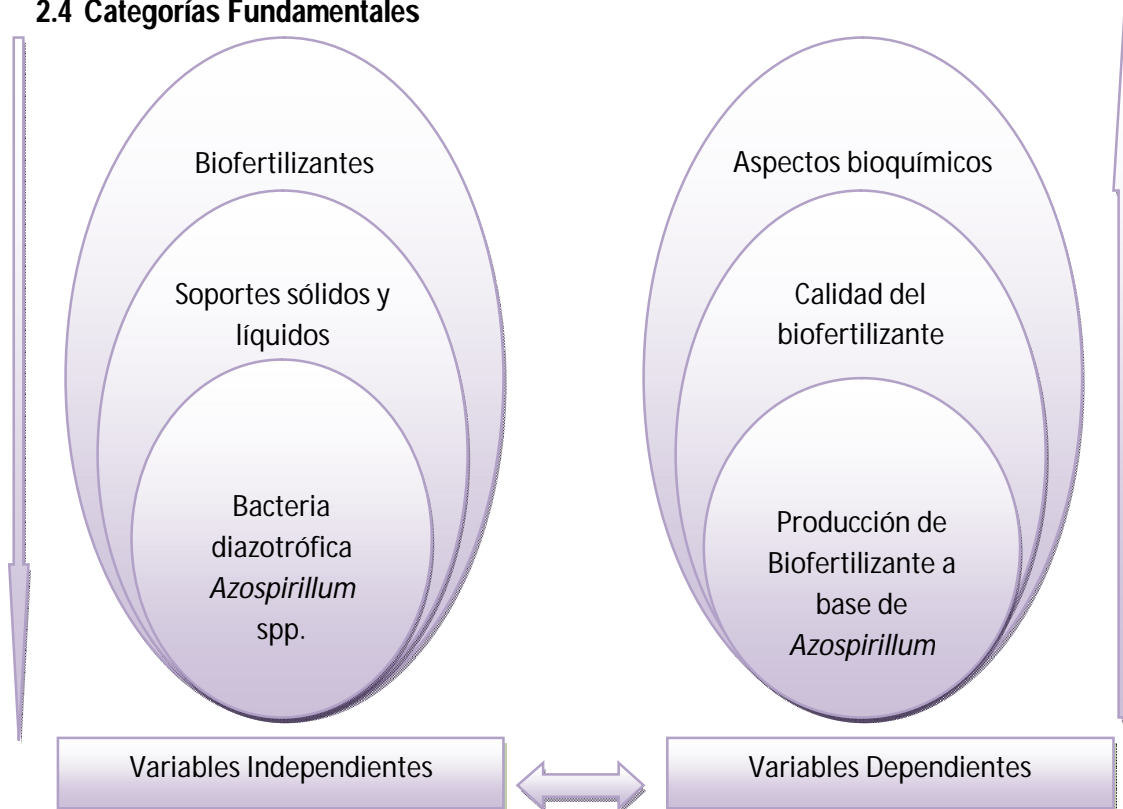


Figura N.2. Red de Inclusión

Elaborado por: Yolanda Pallo

2.5 Hipótesis

2.5.1 Hipótesis Nula (H_0)

H₀1: Ninguno de los doce soportes evaluados permite mantener la sobrevivencia de la bacteria por un lapso de seis meses de almacenamiento.

H₀2: La bacteria *Azospirillum* spp. se desarrolla de igual manera en los seis soportes sólidos durante seis meses de almacenamiento.

H₀3: La bacteria *Azospirillum* spp. se desarrolla de igual manera en los seis soportes líquidos durante seis meses de almacenamiento.

2.5.2 Hipótesis alternativa (H_i)

H_i1: Al menos uno de los doce soportes evaluados permite mantener la sobrevivencia de la bacteria por un lapso de seis meses de almacenamiento.

H_i2: La bacteria *Azospirillum* spp. se desarrolla de diferente manera en los seis soportes sólidos, así como, en los seis soportes líquidos, durante seis meses de almacenamiento.

2.6 Señalamiento de variables de la hipótesis

2.6.1 Variable independiente: soportes sólidos y líquidos evaluados durante seis meses de almacenamiento.

2.6.2 Variable dependiente: Sobrevivencia de la bacteria.

CAPITULO III

LA METODOLOGÍA

3.1 Enfoque

La presente investigación es de carácter cuantitativo, puesto que, se obtendrán resultados numéricos mediante métodos experimentales, como pruebas de sobrevivencia, porcentajes de contaminación, costos de producción, entre otros, que contribuirán a la selección del mejor soporte sólido y/o líquido para la producción del biofertilizante a base de *Azospirillum* spp. aplicable al cultivo de maíz.

3.2 Modalidad básica de investigación

El presente trabajo investigativo se fundamenta en las siguientes modalidades:

3.2.1 Bibliográfica – documental

Se aplicó con el propósito de conocer, comparar, ampliar, profundizar y deducir diferentes enfoques, teorías, conceptualizaciones y criterios de diversos autores sobre temas relacionados al desarrollo de la investigación, basándose en documentos, libros, revistas científicas, y otras publicaciones. Es así que, para solucionar el problema propuesto se requiere la revisión documental de manera periódica para establecer adecuadamente los protocolos para la ejecución de la fase experimental, y también conocer resultados obtenidos y experiencias de investigaciones anteriores con la finalidad de solucionar el problema planteado.

3.2.2 Experimental

Se plantearon diferentes alternativas de soportes sólidos y líquidos como variables independientes para observar los efectos en las respectivas variables dependientes, como son concentración de la bacteria, pH de los soportes, porcentaje de materia orgánica, porcentaje de contaminación y finalmente costos de producción, con el propósito de precisar la relación causa – efecto; es así que en el presente trabajo investigativo se propone un diseño experimental que relaciona las variables dependiente e independiente. El presente trabajo se lo llevó a cabo en la planta piloto destinada a la producción del biofertilizante, en la Estación Experimental Santa Catalina, del Instituto Nacional Autónomo de Investigaciones Agropecuarias, a y través de técnicas e instrumentos

estadísticos y de laboratorio se realizó el procesamiento de los datos experimentales para llegar a obtener resultados sujetos a interpretación.

3.3 Nivel o tipo de investigación

3.3.1 Exploratorio

Se realizó un seguimiento durante seis meses, de diferentes parámetros como concentración de la bacteria, porcentaje de contaminación, pH y porcentaje de materia orgánica, en los diferentes soportes sólidos y líquidos inoculados con la cepa de *Azospirillum* spp. procedente de la provincia de Bolívar, para que mediante un análisis de datos cuantitativos aprobar o invalidar las hipótesis establecidas.

3.3.2 Descriptivo

Al finalizar la investigación, se pretende obtener un producto con características enmarcadas dentro de los estándares de fertilizantes biológicos, como tiempo de almacenamiento, concentración bacteriana y pureza.

3.4 Población y muestra

La población estuvo conformada por cada una de las fundas de aluminio-polietileno con 30 ml de cada soporte sólido o líquido, respectivamente, inoculado con la cepa de *Azospirillum* spp. procedente de la provincia de Bolívar.

La muestra estuvo constituida por 2.5 gramos o mililitros tomados de cada funda de aluminio-polietileno con 30 ml de cada soporte sólido o líquido, respectivamente, inoculado con la cepa de *Azospirillum* spp.

3.4.1 Unidad experimental

La unidad experimental estuvo conformada por una funda de aluminio-polietileno con 30 ml de cada soporte sólido o líquido, inoculado con la cepa de *Azospirillum* spp. procedente de la provincia de Bolívar.

3.4.2 Factores en estudio

Estuvieron constituidos por los diferentes materiales utilizados como soportes de *Azospirillum* spp. los cuales fueron seleccionados de acuerdo a investigaciones anteriores, fuentes bibliográficas y pruebas preliminares.

Soportes sólidos

t1: Turba de Chimborazo.- Fue recomendada en el estudio preliminar por Yáñez C. *et al.* 2004, en dicha investigación únicamente se la evaluó durante un mes de almacenamiento, por lo que es necesario estudiar sus características como medio portador de la bacteria por un tiempo más prolongado.

t2: Turba de Chimborazo + 1% CaCO₃ + 3% raíz de maíz.- Se empleó turba finamente molida y tamizada, la cual posee aportes nutricionales para la bacteria, un alto poder de retención de humedad y capacidad buffer (mantiene el pH dentro de un rango constante), además fue mejorada con la adición de carbonato de calcio y raíz de maíz ya que mediante un seguimiento de pH mantuvo un rango de 5.7 – 6.9, el cual es óptimo para la sobrevivencia de la bacteria. La raíz de maíz se agregó con la finalidad de brindar un ambiente nativo a la bacteria, como fuente de carbohidratos y como opción al aprovechamiento de los residuos después de la cosecha en estado de choclo.

t3: Turba con vermiculita.-Además de contar con las propiedades de la turba, la vermiculita que es un mineral compuesto básicamente por silicatos de aluminio, hierro y magnesio, es conocida por su baja densidad aparente y elevada porosidad y es capaz de ofrecer a la bacteria una mayor área específica donde desarrollarse.

t4: Humus de lombriz.- Se utilizó como nueva alternativa de soporte sólido, tomando en cuenta su alto contenido de materia orgánica y su procedencia a partir del tratamiento de residuos.

t5: Zeolita.- Este mineral posee dos propiedades muy importantes: capacidad de adsorción e intercambio iónico, las cuales son muy ventajosas para su uso como soporte de inmovilización.

t6: Alginato.- Es el material más común utilizado para la inmovilización de microorganismos, puesto que es química y físicamente uniforme (Bashan Y., 1998),

cuando el sistema biológico se satura, las esferas que quedan de desecho pueden ser usadas como material para mejorar el suelo, ya que contienen abundante materia orgánica, no contaminante.

Soportes líquidos

t7: Carboximetilcelulosa.- Es un material con un alto porcentaje de celulosa, proporciona energía a la bacteria y a la vez puede actuar como un elemento adherente al momento de la inoculación a la semilla.

t8: Solución Acido Málico.- Al ser específico para *Azospirillum*, garantiza que cuenta con los requerimientos nutricionales necesarios para el desarrollo de la bacteria.

t9: Caldo nutritivo.- Por su composición tiene los requerimientos necesarios para la bacteria, como son fuente de C, N, Ca, Mg, K y Na.

t10: Solución de NFB.- Normalmente es usada para el enriquecimiento de *Azospirillum*, este medio es libre de nitrógeno y con malato como fuente de carbono.

t11: Solución de melaza.- Se empleó como proveedor de energía a la bacteria, por su contenido de hidratos de carbono, tales como: sucrosa, glucosa y fructosa además de vitaminas del grupo B y abundantes minerales, entre los que destacan el Fe, Cu, K y Mg.

t12: Solución aproximada a biofertilizante comercial.- Se utilizó, debido a que al realizar una prueba de crecimiento, resultó una concentración de 1.3×10^8 UFC ml⁻¹ a los siete meses de su producción.

3.4.3 Tratamientos

Los tratamientos estarán constituidos por los factores en estudio: 6 soportes sólidos y 6 líquidos inoculados con la cepa C2-Bolívar de *Azospirillum* spp.

3.4.4 Análisis estadístico

Se utilizó un Diseño Completamente al Azar (DCA) con 5 observaciones, entre tratamientos sólidos y entre tratamientos líquidos para la variable sobrevivencia.

Tabla N. 1. Esquema del análisis de varianza, para la sobrevivencia de *Azospirillum* spp. en seis soportes sólidos o seis soportes líquidos

FUENTES DE VARIACION	GRADOS DE LIBERTAD
Total	29
Tratamientos	5
Error	24

Elaborado por: Yolanda Pallo

En cuanto a las variables, materia orgánica y pH se empleó un Diseño Completamente al Azar (DCA) con 5 observaciones para cada tratamiento durante 180 días de almacenamiento.

Tabla N. 2. Esquema del análisis de varianza, para materia orgánica y pH para cada tratamiento durante 180 días de almacenamiento.

FUENTES DE VARIACION	GRADOS DE LIBERTAD
Total	24
Tratamientos	4
Error	20

Elaborado por: Yolanda Pallo

3.4.5 Análisis funcional

Se calculó el coeficiente de variación y se realizó la prueba de Tukey al 5% para las fuentes de variación que presentaron significación estadística.

3.5 Operacionalización de variables

Variable Independiente: Soportes sólidos y líquidos evaluados durante seis meses de almacenamiento.

Tabla N.3. Operacionalización de la variable Independiente

LO ABSTRACTO		LO OPERATIVO		
CONCEPTUALIZACION	CATEGORIAS	INDICADORES	ITEM BASICO	TECNICAS E INSTRUMENTOS
<p>Los soportes son materiales portadores que brindan protección y los requerimientos necesarios a la bacteria, durante el tiempo de almacenamiento, por lo cual debe cumplir características físicas y químicas, como la esterilidad, uniformidad del material, retención de agua y compatibilidad según la especie microbiana.</p>	<p>-Materiales portadores</p> <p>-Requerimientos necesarios para la bacteria</p> <p>-Características físico-químicas</p> <p>-Compatibilidad con la especie microbiana</p>	<p>- pH</p> <p>-Materia orgánica</p> <p>- Nitrógeno</p> <p>- Fósforo</p> <p>- Potasio</p> <p>- Calcio</p> <p>- Magnesio</p> <p>- Zinc</p> <p>- Cobre</p> <p>- Hierro</p> <p>- Manganeso</p>	<p>¿Los soportes empleados para portar a la bacteria permitirá mantener su sobrevivencia durante seis meses?</p> <p>¿Existe diferencias drásticas de sobrevivencia bacteriana entre soportes sólidos y líquidos?</p> <p>¿Existen cambios considerables de las características físico-químicas de los soportes inoculados durante seis meses de almacenamiento?</p>	<p>-Relación 1:2.5 (soporte: agua) (ISO 10390, 2005).</p> <p>-Gravimetría PEE/L-FBF04 (AGROCALIDAD)</p> <p>-Kjeldahl PEE/L-FBF/01 (AGROCALIDAD)</p> <p>-Colorimétrico PEE/L-FBF/02 (AGROCALIDAD)</p> <p>-Absorción Atómica (llama) PEE/L-FBF/03 (AGROCALIDAD)</p>

Elaborado por: Yolanda Pallo

Variable dependiente: calidad del biofertilizante a base de *Azospirillum* spp. aplicable al cultivo de maíz.

Tabla N.4. Operacionalización de la variable Dependiente

LO ABSTRACTO		LO OPERATIVO		
CONCEPTUALIZACION	CATEGORIAS	INDICADORES	ITEM BASICO	TECNICAS E INSTRUMENTOS
<p>La producción de un biofertilizante a base de <i>Azospirillum</i> spp. se ve limitada por la pérdida de viabilidad de la bacteria en el licor obtenido en el fermentador. En ocasiones, luego de 30 días de almacenamiento, ya no existen células viables, apareciendo frecuentemente grandes contaminaciones de otros microorganismos. La distribución del inoculante requiere su formulación y presentación, como un producto, fácil de aplicar y con posibilidades de almacenamiento, sin que pierda sus propiedades.</p>	-Biofertilizante a base de <i>Azospirillum</i> spp.	Concentración bacteriana	¿Durante cuánto tiempo se mantiene viable la bacteria en los diferentes soportes sólidos y líquidos?	-Conteo en placa en medio ácido málico - rojo congo
	-Viabilidad de la bacteria	Contaminación	¿Cómo se desarrollan las curvas de crecimiento de <i>Azospirillum</i> en los diferentes soportes sólidos y líquidos?	-Diseño experimental cada 45 días entre tratamientos.
	-Contaminación de otros microorganismos	Costos de producción	¿Es posible obtener un biofertilizante libre de contaminación?	Análisis de costos de producción.
			¿Cuál es el costo de producción del biofertilizante?	

Elaborado por: Yolanda Pallo

3.6 Plan de recolección de información

3.6.1 Métodos y técnicas de investigación

3.6.1.1 Reactivación y purificación de cepas liofilizadas.

Previamente se prepararon los medios de cultivo: Ácido Máfico – Rojo Congo sólido para el aislamiento y purificación (Anexo A-1) (Rodríguez y Cáceres. 1982), Peptona al 1% para la reactivación (Anexo A-2) (CIAT, 1988) y Caldo Nutritivo para la propagación (Anexo A-3) (Girard y Rougieux. 1964). Una vez elaborados los medios se esterilizaron junto con materiales de vidrio, asas, agua destilada, etc. a 15 PSI a 121°C, durante 15 minutos.

Para la reactivación se colocó 1 ml de peptona al 1%, en el tubo eppendorf que contenía a la cepa C2-Bolívar liofilizada, posteriormente se agitó en un vórtex hasta homogenizar la mezcla y se inoculó 50 µl en cajas petri con medio Acido Máfico – Rojo Congo sólido, mediante la técnica de dispersión en placa, luego se incubó a 32°C por 7 días, tiempo en el cual se observaron colonias de *Azospirillum* spp. de color rojo escarlata intenso, dichas colonias se aislaron mediante estriado compuesto en cajas petri con medio Ácido Máfico – Rojo Congo sólido, para finalmente incubarlas por 7 días a 32°C y obtener colonias puras de la bacteria.

Para confirmar que la cepa reactivada corresponde a *Azospirillum* spp. se realizaron las siguientes pruebas Bioquímicas (Anexo B):

- Tinción de Gram y Forma celular
- Presencia de la enzima catalasa
- Motilidad
- Fijación de nitrógeno
- Presencia de Poli-β-hidroxibutirato

3.6.1.2 Reactivación de la cepa a partir de raíces de maíz

Previamente se pregerminaron las semillas de maíz INIAP 101 para lo cual se desinfectaron con alcohol industrial durante 1 minuto, inmediatamente se adicionó una solución de hipoclorito de sodio con ácido clorhídrico durante 1 minuto, se enjuagaron con agua destilada estéril por 4 veces, finalmente se colocaron dentro de cajas petri con papel toalla estéril y se incubaron a 25°C durante 3 días. Transcurrido este tiempo, se sembraron en sustrato estéril, dos semillas por maceta bajo invernadero.

Se preparó inoculante líquido con la cepa C2-Bolívar, para lo cual, con la ayuda de un asa de transferencia se retiraron colonias bacterianas aisladas de un estriado compuesto y se colocaron en una botella con 40 ml de caldo nutritivo.

La cepa se propagó en agitación rotatoria a 120 rpm a 19°C durante 8 a 24 horas, hasta obtener la densidad celular de 1 (Fallick E. *et al.*, 1988). En un espectrofotómetro se midió la densidad celular, para lo cual con una pipeta estéril se tomaron 10 ml de la propagación bacteriana en un tubo de ensayo estéril. La muestra se sometió a 540 nm y al obtenerse un valor de 1 en absorbancia, según lo descrito por Bashan Y. *et al.*, 1997, este valor equivale aproximadamente a 1×10^9 UFC.ml⁻¹, posteriormente se tomó 1 ml de la suspensión a un tubo con 9 ml de solución salina al 0.85% y finalmente se transferirán 5 ml a un matraz con 45 ml de solución salina al 0.85%, obteniendo el inoculante líquido con una concentración aproximada de 1×10^7 UFC.ml⁻¹.

Cada planta se inoculó con 5 ml del inoculante líquido (Alcántar G. *et al.*, 1998), con una concentración aproximada de 1×10^7 UFC.ml⁻¹ (Primavesi A., 1982) y se mantuvieron bajo invernadero durante 6 semanas, el riego se realizó de forma periódica con agua común estéril.

Transcurrido este tiempo, se extrajeron las plantas y se lavaron las raíces con agua común estéril, se colocaron sobre papel toalla y se dejó secar a temperatura ambiente durante 24 horas, transcurrido este tiempo se las cortó en trozos muy pequeños y se pesó 1 g de éstas. Se colocó en un tubo de ensayo con 9 ml de agua destilada estéril (dilución 1×10^{-1}). El tubo con la dilución 1×10^{-1} se sometió a un agitador vórtex, inmediatamente se tomó del tubo 1 ml para depositarlo en otro con 9 ml de agua destilada estéril (1×10^{-2}). Repitiendo este procedimiento se prepararon diluciones seriadas hasta 1×10^{-10} .

En tubos de ensayo de 10 ml, se depositaron 6 ml de medio específico semisólido, libre de nitrógeno NFB (nitrogen fixation biological) (Anexo A-4) y se autoclavaron a 121°C a 15 psi por 15 minutos. Se prepararon 3 tubos para cada dilución.

En cada tubo con medio NFB se depositaron 0.3 ml de la dilución y se incubaron durante 14 días a 30°C.

Después de la incubación se consideraron como tubos con crecimiento bacteriano positivo aquellos cuyo medio de cultivo se tornó azul y presentaron una leve película blanquecina a 2-3 mm por debajo de la superficie del medio de cultivo.

Para verificar la presencia de *Azospirillum* spp., en los tubos considerados como positivos, se tomó de ellos alícuotas para estriarlas en cajas petri con medio ácido málico rojo congo, ya que las colonias de *Azospirillum* en este medio deben tornarse de color rojo oscuro o escarlata.

Para ratificar que el nuevo cultivo corresponde a *Azospirillum* spp. se realizaron nuevamente las pruebas Bioquímicas indicadas en el Literal 3.4.1.

3.6.1.3 Producción de suspensión bacteriana

Se seleccionaron cultivos puros de la cepa C2-Bolívar de *Azospirillum* spp. reactivada a partir de raíces de maíz, que se encontraban en medio de cultivo Ácido Málico - Rojo Congo, con la ayuda de un asa de transferencia se retiraron colonias bacterianas aisladas de un estriado compuesto y se colocaron en una botella con 40 ml de caldo nutritivo.

La cepa se propagó en agitación rotatoria a 120 rpm a 19°C durante 24 horas (Fallick *et al.*, 1988). En un espectrofotómetro se midió la densidad celular, para lo cual con una pipeta estéril se tomaron 10 ml de la propagación bacteriana en un tubo de ensayo estéril. La muestra se sometió a 540 nm. y se obtuvo un valor de 1 en absorbancia, según lo descrito por Bashan, 1997, este valor equivale aproximadamente a 1×10^9 UFC.ml⁻¹, posteriormente se transfirió 2,5 ml de ésta suspensión a un tubo con 22,5 ml de solución salina al 0.85% estéril, y estos 25 ml se transfirieron a una botella con 225 ml de solución salina al 0.85%, para constatar la concentración real de la suspensión bacteriana, se realizaron diluciones a partir de la suspensión inicial y se sembraron las correspondientes a 1×10^{-6} y 1×10^{-7} mediante difusión en placa con 5 replicaciones (Anexo C-1).

3.6.1.4 Caracterización material empleado para soportes sólidos

Se aplicó a la turba de Chimborazo, turba de Chimborazo + un porcentaje de Carbonato de Calcio y raíz (Mezcla), turba con vermiculita, Humus de lombriz y zeolita. Se

realizó un análisis de elementos totales, (N, P, K, Mg, S, Fe, Na y C), porcentaje de materia orgánica, pH y textura, (Anexo D-1) de acuerdo a la metodología establecida en el laboratorio de Suelos y Aguas del INIAP.

3.6.1.5 Preparación de inoculantes sólidos

Los diferentes materiales se secaron a 40°C por dos días, se molieron y tamizaron en un tamiz de 180 µm, para posteriormente elaborar los soportes que se emplearon para los tratamientos sólidos. El empacado de los soportes se realizó en fundas de aluminio polietileno y en cada una de ellas se depositó 30 ml del material procesado (se prepararon veinte y cinco fundas de cada tratamiento, de las cuales se utilizaron cinco para cada evaluación de datos). Las fundas selladas fueron esterilizadas en el Departamento de Ciencias Nucleares de la Escuela Politécnica Nacional, mediante aceleración de electrones. La impregnación del inoculante líquido en los soportes sólidos se realizó mediante la inyección de suspensión bacteriana con una concentración de 1×10^7 UFC.ml⁻¹ (Yáñez *et al.*, 2004), el volumen de inóculo líquido que se inyectó, fue de acuerdo al soporte utilizado, (20 ml por cada 50 g de soporte sólido, las cantidades inoculadas se indican en el Anexo C-2), las fundas fueron nuevamente selladas y los soportes inoculados se incubaron a 30°C por 8 días, período en el cual se realizaron movimientos con el fin de homogenizar el material, transcurrido este tiempo se refrigeró a 4°C por 8 días (para lograr desarrollar en la bacteria estructuras de resistencia ante situaciones adversas) de acuerdo a lo citado por Espinoza, 2004, y finalmente fueron almacenados a temperatura ambiente.

Para la preparación del tratamiento de zeolita liofilizada se procedió de la misma manera que en los casos anteriores, hasta los 8 días en refrigeración, luego de éste tiempo se abrieron las fundas asépticamente, se cubrieron con papel filtro estéril y se colocaron dentro de los envases de liofilización y éstos a su vez se acoplaron al liofilizador durante 24 horas. Transcurrido éste periodo se sellaron las fundas y fueron almacenadas a temperatura ambiente.

Para la Inmovilización de células se preparó Alginato de Sodio al 2%, y se mezcló con la suspensión de células bacterianas (Anexo C-3). Con la ayuda de una jeringa se tomaron alícuotas de la mezcla alginato/células y se dejaron caer en cloruro de calcio a

0.2 Molar, las esferas obtenidas se mantuvieron en reposo por 30 minutos (Pérez A. *et al.*, 2002) y se empacó la cantidad correspondiente a 30 ml en cada funda de aluminio polietileno estéril.

3.6.1.6 Preparación de inoculantes líquidos

En el caso de los inoculantes líquidos se eligieron como soportes las siguientes soluciones: Carboximetilcelulosa, medio de cultivo Acido málico-rojo congo, caldo nutritivo, NFB, melaza y solución aproximada a biofertilizante comercial.

Para conocer la concentración a la cual se debían preparar éstas soluciones se realizaron curvas de crecimiento: Concentración de la solución vs. UFC ml⁻¹ (Anexo C-4 a C-9).

De acuerdo a las curvas de crecimiento realizadas, se prepararon los soportes líquidos (Anexo C-11 a C-15) con las siguientes concentraciones:

- Solución de Carboximetilcelulosa 5%
- Solución del medio ácido málico-rojo congo 35%
- Solución de Caldo nutritivo 70%
- Solución del medio NFB 70%
- Solución de melaza 2%

Una vez preparados los soportes líquidos, se empacaron 27 ml de cada uno, en fundas de aluminio polietileno y se esterilizaron a 121°C a 15 psi durante 15 minutos (se prepararon veinte y cinco fundas de cada tratamiento, de las cuales se utilizarán cinco para cada evaluación de datos).

Se preparó la suspensión bacteriana con una concentración de 1x10⁹ UFC.ml⁻¹, de acuerdo a lo citado por Bashan Y., 1997, esta se obtiene al alcanzar el valor de 1 en absorbancia, lo cual se confirmó con anterioridad mediante pruebas de crecimiento por dispersión en placa. Posteriormente en un tubo de ensayo estéril se colocó 1 ml de la propagación bacteriana y 9 ml del soporte líquido, obteniéndose una concentración de 1x10⁸ UFC.ml⁻¹, de ésta dilución se transfirieron 3 ml a una funda de aluminio polietileno estéril con 27 ml de la solución líquida correspondiente (de tal manera que se obtiene una concentración inicial de 1x10⁷ UFC.ml⁻¹, lo cual se confirmó con una prueba de

crecimiento, a partir de la suspensión 1×10^9 UFC.ml⁻¹, (Anexo C-17) se sellaron herméticamente e incubaron a 30°C por 8 días, una vez transcurrido este tiempo se refrigeraron a 4°C por 8 días y finalmente se almacenaron a temperatura ambiente.

La preparación de la solución en base al biofertilizante comercial partió del análisis de minerales totales, nitrógeno total y pH del producto comercial NoctinAzo (Anexo C-10) y de acuerdo a los resultados obtenidos se preparó una solución semejante a esta (Anexo C-16).

3.6.1.7 Análisis inicial de minerales totales

El análisis de minerales totales se realizó al tiempo cero de almacenamiento (Anexo D-2), es decir, luego de los ocho días que los soportes, tanto sólidos, como líquidos, se mantuvieron en refrigeración.

Se sometieron a éste análisis todos los soportes inoculados sólidos y líquidos, a excepción de las perlas de alginato, de acuerdo a la metodología establecida en los Laboratorios de la Agencia Ecuatoriana de Aseguramiento de la Calidad del Agro (Agrocalidad).

3.6.2 Métodos de Evaluación

Las siguientes variables y métodos de evaluación se determinaron a los 0, 45, 90, 135 y 180 días, a fin de realizar una curva de crecimiento durante seis meses de almacenamiento a temperatura ambiente, tiempo promedio establecido por el SENASA (Servicio Nacional de Sanidad Agraria, Argentina), citado por Peticari A., 2006.

3.6.2.1 Sobrevivencia

La evaluación de la sobrevivencia de *Azospirillum* spp. se realizó tomando 2.5 g de cada soporte sólido o 2.5 ml en el caso de los soportes líquidos y se colocaron en 22.5 ml de agua destilada estéril. Se prepararon diluciones a partir de cada soporte inoculado, desde 1×10^{-2} hasta 1×10^{-7} en tubos con 9 ml de agua destilada. De cada dilución se sembró 0.1 ml en una caja Petri con medio Ácido Máfico - Rojo Congo y transcurridos 7 días de incubación a 30°C se determinó la presencia de la bacteria *Azospirillum* spp. mediante conteo en placa (Rodríguez y Cáceres, 1982).

En el caso de los soportes de alginato inoculados, se cuantificaron las células encapsuladas disolviendo 1 g de esferas en citrato de sodio a 0.1 Molar, a partir del cual se realizaron diluciones, desde 1×10^{-2} hasta 1×10^{-7} en tubos con 9 ml de solución salina al 0.85% (Pérez *et al.*, 2002) y se procedió de igual manera que en los casos anteriores hasta el conteo en placa.

Para realizar las curvas de crecimiento, se transformaron las concentraciones bacterianas obtenidas a logaritmos naturales y se graficó: Ln UFC.g^{-1} o Ln UFC.ml^{-1} vs. Tiempo de almacenamiento. Además se calcularon datos de cinética bacteriana, de acuerdo a Pisabarro, 2009, utilizando las siguientes ecuaciones:

- Tasa de crecimiento:
$$\mu = \frac{\text{Ln } N - \text{Ln } N_0}{t}$$

- Tasa de muerte:
$$k = \frac{\text{Ln } N - \text{Ln } N_0}{t}$$

- Número de generación:
$$g = \frac{\mu * t}{\text{Ln } (2)}$$

- Tiempo de generación:
$$T = \frac{t}{g}$$

Donde:

μ : Tasa de crecimiento

N: Número final de unidades formadoras de colonias

N_0 : Número inicial de unidades formadoras de colonias

t: tiempo

k: Tasa de muerte

g: Número de generaciones

T: Tiempo de generación

3.6.2.2 pH

El pH se determinó pesando 10 ml de cada soporte sólido inoculado al cual se le agregó 25 ml de agua destilada. Se empleó un pH-metro previamente calibrado. En el caso de los inoculantes líquidos se midió directamente en la solución (ISO 10390, 2005).

3.6.2.3 Porcentaje de materia orgánica en soportes sólidos

Para la determinación de materia orgánica, se empleó un crisol previamente esterilizado y pesado, donde se depositaron 3 g. de soporte (Peso 1), luego se introdujo en la mufla a 600°C durante 6 horas y se reportó un peso final (Peso 2) (Steugbing L. *et al*, 2001):

$$\% \text{ Materia Orgánica} = \frac{\text{Peso1} - \text{Peso2}}{\text{Peso 1}} * 100$$

3.6.2.4 Porcentaje de contaminación

Esta variable se evaluó contabilizando el número total de colonias que se presentaron en las cajas empleadas para la prueba de sobrevivencia, el cual representó el 100% de la población, posteriormente se contó el número de colonias que no pertenecieron al género *Azospirillum*, que correspondió al porcentaje de contaminación.

3.6.3 Análisis Post-Evaluación

3.6.3.1 Pruebas Bioquímicas

Se realizaron pruebas Bioquímicas (Anexo B) con la finalidad de confirmar que la población bacteriana obtenida al finalizar el tiempo de almacenamiento, corresponde a la cepa inicialmente inoculada.

3.6.3.2 Análisis final de minerales totales

Se realizaron análisis de minerales totales, a los soportes inoculados sólidos y líquidos (Anexo D-3), a excepción de las perlas de alginato, al finalizar los seis meses de almacenamiento. La metodología aplicada fue de acuerdo a los procedimientos establecidos en los Laboratorios de Agrocalidad.

3.6.3.3 Análisis de costos de producción

Se evaluó el costo de producción de cada tratamiento que presentó una población igual o mayor a $1 \times 10^7 \text{ UFC.ml}^{-1}$, aplicando la siguiente fórmula:

$$\text{CP} = \text{MPD} + \text{MOD} + \text{CIF}$$

Donde:

CP: Costo de producción

MPD: Materia prima directa

MOD: Mano de obra directa

CIF: Costos indirectos de fabricación

(Naranjo J. y Naranjo M., 2003).

3.7 Plan de procesamiento y análisis de la información

Los resultados obtenidos de las pruebas de sobrevivencia durante seis meses, se procesaron en base a un estudio estadístico con la ayuda del programa INFO-STAT.

En cuanto al pH y porcentaje de materia orgánica, se realizó análisis de varianza para cada tratamiento, durante los 180 días de almacenamiento.

El análisis de la información se realizó mediante comparaciones de los resultados obtenidos en la fase experimental que se respaldaron con revisión bibliográfica, al igual que los resultados obtenidos del estudio estadístico, y de ésta manera lograr establecer conclusiones y recomendaciones sobre la investigación desarrollada.

CAPITULO IV

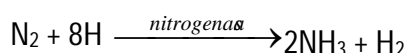
ANÁLISIS E INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS

4.1 Pruebas Bioquímicas en cepa reactivada.

De acuerdo a lo descrito por Mortimer P. *et al.*, 1981, *Azospirillum* es un género de proteobacterias gram negativas de forma bacilar (Madigan M. *et al.*, 2000), lo que concuerda con los resultados obtenidos en la prueba de tinción de gram y forma celular (Anexo F-2.) realizadas a la cepa reactivada tanto a partir del liofilizado, como la obtenida luego de la reactivación en planta.

Además, se realizó una prueba para determinar la presencia de la enzima catalasa, que fue confirmada al observarse el desprendimiento de Oxígeno en forma de burbujas de una colonia de la cepa C2-Bolívar de *Azospirillum* spp. (Anexo F-3.) luego de añadir peróxido de hidrógeno, resultando la siguiente reacción: $2\text{H}_2\text{O}_2 \xrightarrow{\text{catalasa}} 2\text{H}_2\text{O} + \text{O}_2$, donde la catalasa actúa destruyendo formas tóxicas del oxígeno (Madigan M. *et al.*, 2000). Por otra parte al realizarse la prueba de motilidad ésta resultó positiva, evidenciándose claramente un crecimiento radial a partir del punto de inoculación tal como se aprecia en el Anexo F-4. La motilidad de la bacteria se atribuye a que ésta cuenta con un flagelo polar y varios laterales, que le permiten desplazarse en medios líquidos y gelificados (Baca B., 2002), corroborando de ésta manera los resultados obtenidos por Espinoza L., 2004.

Con respecto a la Fijación de nitrógeno, la cepa C2-Bolívar, reactivada a partir de liofilizado y posteriormente a partir de raíces de maíz, cambió la coloración del medio de enriquecimiento, de verde a azul, (Anexo F-5), indicándose así un cambio de pH, el cual se atribuye a la siguiente reacción:



Donde, el nitrógeno molecular es reducido a amoníaco, acidificando el medio y produciéndose así, el viraje de coloración del indicador, azul de bromotimol.

La presencia de gránulos de poli-β-hidroxibutirato, únicamente se apreció en la cepa C2-Bolívar reactivada a partir del liofilizado (Anexo F-6), mientras que en la cepa C2-Bolívar reactivada a partir de raíces de maíz, su presencia fue nula, esto se debe, a que éste polímero es un medio de protección ante las adversidades del medio, como falta de nutrientes, desecación, etc. y el objeto de reactivar la cepa en plantas de maíz, es

refrescar a la bacteria, brindándole su hábitat natural, con los requerimientos necesarios para su desarrollo.

4.2 Análisis de resultados

4.2.1 Evaluaciones de soportes sólidos y líquidos durante seis meses de almacenamiento

4.2.1.1 Sobrevivencia de *Azospirillum* spp.

Las diferentes concentraciones obtenidas en las pruebas de sobrevivencia en tratamientos sólidos (Tabla D-4) y líquidos (Tabla D-6) fueron transformadas a Ln UFC.g⁻¹ (Tabla D-5) o Ln UFC.ml⁻¹ (Tabla D-7), según corresponda y se realizaron curvas de crecimiento, Figura D-1 y Figura D-2.

Tomando en cuenta que se trata de un biofertilizante, donde la bacteria está obligada a mantenerse en un ambiente cerrado, uno de los factores que contribuye para su sobrevivencia es la reducida concentración de Oxígeno, lo cual es favorable para el mantenimiento de *Azospirillum*, debido a la sensibilidad del complejo nitrogenasa al Oxígeno molecular, el cual inactiva de forma irreversible a la enzima (Zuberer D., 1990). Otro factor que nos presenta ésta bacteria, es que al ser Gram negativa, tiene la capacidad de sintetizar aminoácidos vitales, mientras que los cocos Gram positivos, únicamente pueden crecer en medios que contengan aminoácidos (Redvet, 2007).

Como se puede apreciar en el Anexo D, Figura D-1 y Figura D-2, en ninguno de los soportes la bacteria presenta fase de latencia, esto se debe a que la suspensión bacteriana se inoculó en fase de crecimiento exponencial, donde el microorganismo estuvo adaptado al medio inicial (Caldo Nutritivo) y al inocularlo en los diferentes soportes se enfrenta a un variante de nutrientes y condiciones medioambientales, que al ser favorables se traducen a un crecimiento exponencial al inicio del almacenamiento, como es el caso de los tratamiento t1: Turba de Chimborazo, t3: Turba con vermiculita, t4: Humus de lombriz, t6: Perlas de Alginato, t10: Solución de NFB al 70% y t11: Solución de melaza al 2%, estos resultados se aprecian los primeros 45 días de almacenamiento, continuando con una fase de declive, donde se observa que en el t1: Turba de Chimborazo y en el t4: humus de lombriz, la bacteria presenta una mayor tasa de muerte. Por otra parte, en los soportes que cuentan con concentraciones de nutrientes y

condiciones medioambientales contraproducentes, con respecto al caldo nutritivo inicial, la población bacteriana decrece desde el inicio del almacenamiento, dando lugar a una fase de declive o muerte, como es el caso del tratamiento t2: Turba de Chimborazo + 1% CaCO_3 + 3% raíz de maíz (Mezcla), t5: zeolita liofilizada, t8: Solución de ácido málico-rojo congo al 35%, t9: Solución de Caldo Nutritivo al 70% y t12: solución aproximada a biofertilizante comercial.

De acuerdo a las curvas de crecimiento realizadas, la bacteria se encuentra mayor tiempo en fase de declive que en una fase de crecimiento exponencial, sin identificarse las fases de latencia y estacionaria, este comportamiento no significa que la bacteria haya perdido su viabilidad para actuar en campo, ya que, según lo señalado por Willey J. *et al.*, 2008, el hecho que el microorganismo se halle en fase de muerte, no quiere decir que las células hayan perdido irreversiblemente su capacidad para reproducirse, únicamente, en esta fase los microorganismos son temporalmente incapaces de crecer, en este caso, bajo las condiciones que le brinda el soporte dentro de la bolsa sellada, a temperatura ambiente, y una vez que la bacteria es expuesta a condiciones apropiadas, al momento de la inoculación, el microorganismo reanuda su crecimiento.

En cuanto a la cinética del desarrollo bacteriano en soportes sólidos, de acuerdo a la Tabla D-8. en el tratamiento t3: Turba con vermiculita, la bacteria crece con mayor rapidez, con un tiempo por generación de 10.09 días, ocurriendo 4.46 generaciones durante los primeros 45 días de almacenamiento, que constituyen la fase de crecimiento exponencial, mientras que en los siguientes 135 días de almacenamiento, la tasa de muerte es de 0.0251 día^{-1} , siendo la menor entre los seis tratamientos sólidos, constituyendo la mejor alternativa, para mantener la sobrevivencia de la bacteria durante el almacenamiento. En el caso de los tratamientos t2: Mezcla y t5: Zeolita liofilizada, no existe una fase exponencial, por lo tanto la tasa de crecimiento, número y tiempo de generación es cero, únicamente presenta fase de declive, con una tasa de muerte de 0.0307 en el tratamiento t2 y 0.0308 en el tratamiento t5. Con respecto al tratamiento t1: Turba de Chimborazo, es el que presenta menor rapidez de crecimiento bacteriano en la fase exponencial, requiriendo 39.08 días para producir una nueva generación, es así que a los 45 días de almacenamiento, se generan 1.15 generaciones, presentando a continuación una tasa de muerte de 0.0834 día^{-1} que es la más alta junto a la del humus

de lombriz. En el tratamiento t6: perlas de alginato, ocurren 2.87 generaciones bacterianas en los 45 días de la fase exponencial, con un tiempo por generación de 15.66 días. Pasando a la fase de declive con una tasa de muerte de 0.0366 día⁻¹.

De acuerdo a los resultados obtenidos en la cinética de la cepa C2-Bolívar en soportes líquidos, Tabla D-9, los tratamientos t7: Solución de CMC 5%, t8: Solución ácido málico-rojo Congo 35%, t9: Solución de Caldo nutritivo 70% y t12: Solución aproximada a biofertilizante comercial, no presentan fase exponencial, por lo tanto, es nula, la tasa de crecimiento, número y tiempo de generación, presentando únicamente fase de declive, durante los 180 días de almacenamiento, donde el tratamiento t8, muestra la mayor tasa de muerte, 0.0659 días⁻¹, seguida del tratamiento t7, 0.0592 días⁻¹, posteriormente el tratamiento t9, con una tasa de muerte de 0.0508 días⁻¹, y finalmente el tratamiento t12 con 0.0308 días⁻¹. Mientras que en el tratamiento t10: Solución de NFB 70%, ocurren 2.826 generaciones en los 45 días de la fase exponencial, empleando 15.92 días para dar lugar a cada nueva generación, atravesando la fase de declive los siguientes 135 días de almacenamiento, con una tasa de muerte de 0.0187 días⁻¹, siendo la menor entre los seis soportes líquidos evaluados. En el tratamiento t11: Solución de melaza al 2%, se desarrolla con mayor rapidez, con un tiempo por generación de 15 días, dando lugar a 3 generaciones en los primeros 45 días de almacenamiento que equivale a la fase de crecimiento exponencial, continuando con la fase de declive, con una tasa de muerte de 0.0191 días⁻¹, que es prácticamente igual a la del tratamiento t10: Solución de NFB al 70%. Consecuentemente los tratamientos más recomendables para la producción de un biofertilizante líquido, son la Solución de NFB al 70% y la de Melaza al 2%.

Al realizar los análisis de varianza, para la variable de sobrevivencia de *Azospirillum* spp. en soportes sólidos, durante los 180 días de almacenamiento, cada 45 días, Tabla E-6, existe una diferencia altamente significativa entre los 6 soportes sólidos empleados como materiales portadores para la bacteria, dando lugar a que la cepa C2-Bolívar de *Azospirillum* spp. se desarrolle de diferente manera en cada uno de ellos.

De acuerdo a la prueba de Tukey al 5%, Tabla E-7, para la variable sobrevivencia de *Azospirillum* spp. en soportes sólidos, a los 0 días de almacenamiento, se diferencian cuatro rangos de significación, ubicándose en el primer rango (a) el tratamiento t1: Turba

de Chimborazo con una concentración de 1.54×10^{10} UFC.g⁻¹ y en el rango (d) el tratamiento t6: Perlas de Alginato, con una concentración de 3.00×10^8 UFC.g⁻¹.

Para la sobrevivencia de *Azospirillum* spp. a los 45 días de almacenamiento, se forman cuatro rangos de significación, donde los tratamientos t1: Turba de Chimborazo y t4: Humus de lombriz, se ubican en el primer rango, al alcanzar una mayor concentración, 3.41×10^{10} UFC.g⁻¹ y 3.61×10^{10} UFC.g⁻¹ respectivamente, resultando estadísticamente iguales. Mientras que en el último grupo (d) comparten los tratamientos t2: Mezcla y t5: Zeolita liofilizada, con concentraciones de 6.40×10^8 UFC.g⁻¹ y 4.20×10^8 UFC.g⁻¹ correspondientemente.

De acuerdo a la prueba de Tukey al 5%, realizada a los 90 días de almacenamiento, se diferencian cuatro rangos de significación, donde los tratamientos t2: Turba de Chimborazo + 1% CaCO₃ + 3% raíz de maíz y t3: Turba con vermiculita, ocupan el primer grupo, con una mayor concentración bacteriana, 6.40×10^8 y 1.74×10^9 UFC.g⁻¹

Mientras que a los 135 días de almacenamiento, se forman cuatro rangos de significación, siendo el tratamiento t3: Turba con vermiculita, el que presenta mayor sobrevivencia bacteriana, 7.64×10^8 UFC.g⁻¹. En tanto que, los tratamientos con menor concentración son t1: Turba de Chimborazo, con 1.00×10^7 UFC.g⁻¹ y t4: Humus de lombriz, con 1.40×10^7 UFC.g⁻¹.

Finalmente, a los 180 días de almacenamiento, de acuerdo a la prueba de Tukey al 5%, se diferencian, cinco rangos de significación, donde el mayor promedio presenta el tratamiento, t3: Turba con vermiculita, con una concentración de 5.52×10^8 UFC.g⁻¹, mientras que en el último grupo se ubica el tratamiento t1: Turba de Chimborazo, con 9.60×10^5 UFC.g⁻¹.

De acuerdo al Análisis de varianza para la sobrevivencia de *Azospirillum* spp. en los soportes líquidos, Tabla E-13, existe una diferencia altamente significativa entre los seis tratamientos, es decir, la C2-Bolívar de *Azospirillum* spp. se desarrolla de diferente manera en los seis soportes líquidos, durante los 180 días de almacenamiento.

Al realizar la prueba de Tukey al 5%, Tabla E-14, para la variable sobrevivencia de *Azospirillum* spp. en soportes líquidos, a los 0 días de almacenamiento, se forman tres

rangos de significación, donde los tratamientos t7: Solución de CMC al 5% y t8: Solución de Ácido málico rojo congo al 35%, presentan una concentración de 3.56×10^{10} UFC.ml⁻¹ y 4.53×10^{10} UFC.ml⁻¹ conformando el primer rango (a), siendo estadísticamente iguales, mientras que los tratamientos que presentan menor concentración son t10: Solución de NFB al 70% y t11: Solución de melaza al 2%, con 2.20×10^8 UFC.ml⁻¹ y 3.00×10^8 UFC.ml⁻¹ respectivamente.

A los 45 días de almacenamiento, se diferencian tres rangos de significación, de acuerdo a la prueba de Tukey al 5%, en donde se aprecia mayor sobrevivencia bacteriana en los tratamientos t10: Solución NFB al 70%, t11: Solución de melaza al 2% y t12: Solución aproximada a biofertilizante comercial, con concentraciones de 1.56×10^9 , 2.40×10^9 y 3.54×10^9 UFC.ml⁻¹. Mientras que el tratamiento t9: Solución de caldo nutritivo, con una concentración de 4.80×10^7 UFC.ml⁻¹, es el que presenta menor población de la cepa C2-Bolívar.

Al término de los 90 días de almacenamiento, se aprecian tres rangos de significancia, donde los mayores promedios son 2.60×10^8 UFC.ml⁻¹ y 4.80×10^8 UFC.ml⁻¹ correspondientes a los tratamientos t10: Solución de NFB al 70% y t11: solución de melaza al 2%, siendo estadísticamente iguales. Por otra parte, el tratamiento t9: Solución de caldo nutritivo, con 4.60×10^7 UFC.ml⁻¹ es el que presenta menor sobrevivencia.

A los 135 días de almacenamiento, continúan prevaleciendo los tratamientos t10 y t11 con mayores promedios de concentraciones entre los tratamientos líquidos, en tanto que el tratamiento t9: presenta la menor población bacteriana.

Al finalizar los 180 días de almacenamiento, se forman cinco rangos de significación, donde, el tratamiento que ha mantenido mayor concentración bacteriana es el t11: Solución de melaza al 2% con 3.86×10^8 UFC.ml⁻¹ y menor población bacteriana los tratamientos t8: Solución de medio ácido málico-rojo congo y t9: Solución de caldo nutritivo, con 2.40×10^7 y 3.00×10^7 UFC.ml⁻¹.

4.2.1.2 pH

Los promedios de los pHs obtenidos durante los 180 días de almacenamiento en los soportes sólidos y líquidos se indican en la Tabla D-10, donde se aprecia en general

que el metabolismo bacteriano tiende a acidificar el medio. La mayor parte de las bacterias muestra una tasa de crecimiento óptimo en el rango de pH entre 6.5 y 7.5. Sin embargo, las bacterias son capaces de desarrollarse en forma correcta con un pH entre 4.0 y 10.0 (Rodríguez D. *et. al.* 2004).

De acuerdo al análisis de varianza, Tabla E-27 y E-28, realizado con la finalidad de determinar si es o no significativa la variación de pH en cada tratamiento durante los 180 días de almacenamiento, no se identificó una diferencia altamente significativa en los tratamientos t1: Turba de Chimborazo, t2: Mezcla, t3: Turba con vermiculita, t4: Humus de lombriz, t6: perlas de alginato, t7: solución de CMC al 5%, t9: Caldo nutritivo al 70%, t10: Solución NFB al 70% y t11: Solución de melaza al 2%, mientras que en los tratamientos t5: Zeolita liofilizada, t8: Solución de medio ácido málico-rojo congo al 35% y t12: Solución aproximada a biofertilizante comercial, se puede apreciar una leve acidificación en cada soporte.

La conservación del rango de pH en los tratamientos: t1: Turba de Chimborazo, t2: Turba Chimborazo + 1% CaCO₃ +3% Raíz de maíz, t3: Turba con vermiculita, t4: Humus de lombriz y t6: perlas de alginato, se debe a que cuentan con un alto porcentaje de materia orgánica, proporcionándole al soporte una mayor capacidad tampón, estabilizando de ésta manera el pH, ante los productos del metabolismo microbiano (Binato A., 2001 Citado por Estrada G., 2008).

Con respecto a los tratamientos t7: solución de CMC al 5%, t9: Caldo nutritivo al 70%, t10: Solución NFB al 70% y t11: Solución de melaza al 2%, en donde el pH, no presenta una diferencia altamente significativa, durante los 180 días de almacenamiento, estos resultados se atribuyen a que las vías metabólicas están reguladas para mantener un equilibrio adecuado de los componentes celulares, incluso ante un ambiente cambiante, y para conservar la energía y las materias primas, existen tres tipos principales de regulación de las vías metabólicas: canalización metabólica, regulación de la actividad enzimática, y regulación de la síntesis de enzimas (Willey *et.al.*, 2008).

De acuerdo al análisis estadístico, el pH de los tratamientos: t5: Zeolita liofilizada, t8: Solución de medio ácido málico-rojo congo al 35% y t12: Solución aproximada a biofertilizante comercial, varía durante los 180 días de almacenamiento, obteniéndose

una leve acidificación, cuyos resultados se encuentran bordeando los rangos de pH establecidos por parte del "Bureau of Indian Standards", Normativa IS: 14806:2000, para los biofertilizantes a base de *Azospirillum*, en donde se señala que el rango óptimo es de 6,5 a 7,5. (Mishra B. 2000).

4.2.1.3 Porcentaje de materia orgánica en soportes sólidos

En la Tabla D-11. se aprecian los promedios de los porcentajes de materia orgánica en cada tratamiento durante 180 días de almacenamiento, donde se observa que el tratamiento t3: Turba con vermiculita, presenta el más alto porcentaje de materia orgánica, seguido del t4: Humus de lombriz, luego el tratamiento t1: Turba de Chimborazo y con menor porcentaje de materia orgánica el t2: Mezcla, estos resultados tienen una relación directamente proporcional con las tasas de crecimiento, es decir, a mayor porcentaje de materia orgánica, el microorganismo presenta una mayor tasa de crecimiento.

Al relacionar el pH con el porcentaje de materia orgánica, se afirma que los niveles altos de materia orgánica contribuyen al mantenimiento constante del pH, lo que se aprecia en los tratamientos t1-t4, que al ser materiales provenientes de la descomposición de desechos orgánicos, su nivel de materia orgánica es elevado, mientras que en el t5: zeolita liofilizada, al ser un material netamente mineral, su porcentaje de materia orgánica, es nulo, y prácticamente, los resultados obtenidos de materia orgánica en este soporte, corresponden a la masa bacteriana existente.

Al realizar el análisis de varianza, para el porcentaje de materia orgánica, en cada uno de los tratamientos sólidos inoculados (t1-t5), durante los 180 días de almacenamiento, Tabla E-34, no se evidencia una diferencia altamente significativa, lo que quiere decir que el porcentaje de materia orgánica se mantiene prácticamente constante durante el almacenamiento.

4.2.1.4 Porcentaje de contaminación

En el transcurso de los seis meses de almacenamiento, no se apreció contaminación, únicamente irregularidad en el borde, elevación y consistencia de ciertas colonias, las cuales se confirmaron como *Azospirillum* spp. mediante pruebas Bioquímicas realizadas al finalizar la investigación.

4.2.2 Análisis Post-Evaluación

4.2.2.1 Pruebas Bioquímicas

En el transcurso de los seis meses de almacenamiento, se obtuvieron en las pruebas de sobrevivencia, colonias de coloración rojo escarlata en medio ácido málico-rojo congo, pero, algunas de éstas presentaron variaciones en cuanto a la regularidad del borde, elevación y consistencia, por lo cual, se seleccionaron cinco de éstas colonias (se las identificó como PA1, PA2, PA3, PA4 y PA5), se las aisló en medio ácido málico-rojo congo, luego en medio agar nutriente, para finalmente realizar pruebas bioquímicas, con la finalidad de descartar una posible contaminación. Los resultados se indican en la Tabla D-12.

De acuerdo a las pruebas bioquímicas realizadas, se descarta totalmente que se trate de contaminación, estas variaciones se atribuyen al estrés que se enfrentan las células al ser sometidas a condiciones limitadas de nutrientes. Es así que la presencia de Poli- β -hidroxibutirato, es muy notable, este polímero es generado por la célula como medio de protección ante la falta de humedad del medio, sirviendo como almacén de Carbono y energía (Okon Y. e Itzigsohn R., 1992).

4.2.2.2 Análisis de costos de producción de los mejores tratamientos

Se han considerado como mejores tratamientos aquellos que han alcanzado una concentración igual o mayor a 1×10^7 UFC.ml⁻¹ a los seis meses (180 días) de almacenamiento, puesto que, a esta concentración es factible su inoculación en campo, de acuerdo a Okon y Gonzales, 1994.

De acuerdo al análisis de costos de producción, cuyos resultados se indican en las Tablas D-22 y D-23, el tratamiento sólido que presenta menor costo de producción es el t6: Perlas de alginato, con un valor de 1.63 dólares, seguido por el tratamiento t2: Turba de Chimborazo + 1% CaCO₃ + 3% raíz de maíz, con un costo de 1.65 dólares, mientras que el más costoso, es el t3: Turba con vermiculita, con un costo que asciende a los 2.11 dólares. Entre los tratamientos líquidos el biofertilizante a base de *Azospirillum* spp. soportado en solución de melaza al 2%, es el tratamiento más conveniente, con un costo de 1.10 dólares.

4.3 Verificación de la Hipótesis.

Al realizar el análisis de resultados de la evaluación de soportes sólidos y líquidos para la producción de un biofertilizante a base de *Azospirillum* spp. se rechazan las hipótesis nulas y se aceptan las alternativas:

1. Al menos uno de los doce soportes evaluados permite mantener la sobrevivencia de la bacteria por un lapso de seis meses de almacenamiento.

Tomando en cuenta, que la concentración mínima de un biofertilizante de *Azospirillum* spp. apto para la inoculación en campo, es de 1×10^7 UFC.ml⁻¹ o UFC.g⁻¹ (Okon y Gonzales, 1994), once de los doce soportes evaluados, mantuvieron la población bacteriana superior a este valor durante los seis meses de almacenamiento.

2. La bacteria *Azospirillum* spp. se desarrolla de diferente manera en los seis soportes sólidos, así como, entre los seis soportes líquidos, durante seis meses de almacenamiento.

De acuerdo al análisis de varianza para la sobrevivencia de *Azospirillum* spp. existe diferencia altamente significativa, tanto entre soportes sólidos, como entre soportes líquidos, determinándose así, que la bacteria se desarrolla de diferente manera de acuerdo a los requerimientos nutricionales que le provee cada soporte evaluado.

CAPITULO V CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

5.1 Conclusiones

- La cepa C2-Bolívar se desarrolla de diferente manera en cada uno de los doce soportes durante seis meses, es así que, a los 0 días de almacenamiento se obtiene mayor sobrevivencia en la solución de medio ácido málico-rojo congo 35%, solución de Carboximetilcelulosa 5% y en la turba de Chimborazo, mientras que a los 45 días de almacenamiento se identifica más unidades formadoras de colonias por gramo en el humus de lombriz y turba de Chimborazo, a los 90 días de almacenamiento presentan mayor concentración bacteriana la turba con vermiculita y la mezcla (Turba de Chimborazo + 1% CaCO₃ + 3% raíz de maíz). A los 135 días de almacenamiento la bacteria alcanza mayor sobrevivencia en la Turba con vermiculita, solución de melaza 2% y mezcla. Finalmente a los 180 días de almacenamiento la bacteria alcanza una mayor concentración en la Turba con vermiculita y Solución de melaza al 2%.
- De acuerdo a las curvas de crecimiento desarrolladas, la bacteria no presenta una fase de latencia en ninguno de los soportes inoculados, se aprecia un crecimiento exponencial en la Turba de Chimborazo, Turba con vermiculita, Humus de lombriz, Perlas de Alginato, Solución de NFB al 70% y Solución de melaza al 2%, estos resultados se aprecian los primeros 45 días de almacenamiento, continuando con una fase de declive, donde se observa que en la turba de Chimborazo y en el humus de lombriz, la bacteria presenta una mayor tasa de muerte. Por otra parte, en la mezcla de turba de Chimborazo + CaCO₃ + raíz de maíz (Mezcla), zeolita liofilizada, Solución de ácido málico-rojo congo al 35%, Solución de Caldo Nutritivo al 70% y solución aproximada a biofertilizante comercial, se observa una fase de declive desde el inicio del almacenamiento, presentándose una mayor tasa de muerte bacteriana en la solución de ácido málico-rojo congo y en la solución de Carboximetilcelulosa.
- En la presente investigación se obtuvo como resultado que los mejores soportes sólidos para la producción de un biofertilizante a base de *Azospirillum* spp. son las perlas de alginato y la turba con vermiculita, puesto que a los seis meses de

almacenamiento, presentan una concentración de $6,00 \times 10^7$ UFC.g⁻¹ y $5,52 \times 10^8$ UFC.g⁻¹, respectivamente. Para la producción del biofertilizante líquido los soportes más adecuados son la solución de NFB al 70% y la solución de melaza al 2%, con una concentración de $1,6 \times 10^8$ UFC.ml⁻¹ y $3,86 \times 10^8$ UFC.ml⁻¹, respectivamente, con las menores tasas de muerte entre los soportes líquidos. Además estos cuatro soportes, mantienen la concentración bacteriana, dentro del rango permitido para su utilización en campo, durante los seis meses de almacenamiento.

- De los doce soportes evaluados, únicamente en t1: Turba de Chimborazo no se obtiene una concentración igual o superior a 1×10^7 UFC.g⁻¹ o UFC.ml⁻¹, a los seis meses de almacenamiento (concentración adecuada para la aplicación en campo), por otra parte al tomar en cuenta los costos de producción, se descarta la Turba con vermiculita, a pesar de ser en la que se alcanza una mayor concentración bacteriana, puesto que, el costo de producción de 30 ml de biofertilizante es de 2.11 dólares, y se elige como mejor soporte sólido a las perlas de alginato con un costo de producción de 1.63 dólares y alternativamente a la mezcla (T. Chimborazo + 1% CaCO₃ + 3% raíz maíz) con un costo de producción de 1,65 dólares. Como soporte líquido se selecciona a la solución de melaza al 2%, con un costo de producción de 1.10 dólares la funda de 30 ml de producto.

5.2 Recomendaciones

- Evaluar los dos biofertilizantes obtenidos para el cultivo de maíz, en diferentes zonas de la Sierra ecuatoriana, para verificar la efectividad tanto de la cepa, como del soporte.
- Desarrollar una tecnología adecuada para la inoculación de la cepa C2-Bolívar soportada en perlas de alginato.
- Para disminuir el costo de producción de los biofertilizantes sólidos (t1-t5), se sugiere utilizar un tamizador eléctrico, para que de ésta manera, el costo de mano de obra sea reducido, y consecuentemente el costo del biofertilizante.
- Evaluar los biofertilizantes obtenidos, en diferentes cultivos, para probar su eficiencia y especificidad de la cepa.

- De acuerdo a bibliografía, otro requerimiento muy importante para los diferentes cultivos, incluido el de maíz, es el fósforo, por lo que sería importante aislar e identificar cepas de microorganismos solubilizadores de fósforo, probar su eficiencia en campo, evaluar su compatibilidad con *Azospirillum*, y en caso de ser factible, finalmente desarrollar un biofertilizante con propiedades de fijación de nitrógeno y solubilización de fosforo en el suelo.

CAPITULO VI

PROPUESTA

6.1 Datos Informativos

6.1.1 Título:

Evaluación de un biofertilizante sólido y líquido a base de cepas de *Azospirillum* spp. en el cultivo de maíz (*Zea mays* L.), en complemento con tres tipos de fertilización en la variedad INIAP 124.

6.1.2 Unidad Ejecutora:

Programa de Maíz de la Estación Experimental Santa Catalina (EESC) del Instituto Nacional Autónomo de Investigaciones Agropecuarias (INIAP).

6.1.3 Beneficiario:

-Agricultores de la Sierra ecuatoriana

-Profesionales y estudiantes en las áreas de Agricultura sustentable, Agrobiotecnología y afines.

6.1.4 Director del Proyecto:

-Ing. MSc. Carlos Yáñez

6.1.5 Personal Operativo:

-Técnicos del Programa de Maíz del INIAP

-Egresado/a de Carreras a fines a la Agrobiotecnología.

6.1.6 Tiempo de Duración:

9 meses

6.1.7 Lugar de Ejecución:

Planta Piloto de Producción de Biofertilizante de *Azospirillum* spp. y terrenos de la Sección Oriental del INIAP-EESC.

6.1.8 Costo:

6860 dólares americanos

6.2 Antecedentes de la propuesta

En Ecuador, el maíz (*Zea mays* L.) es uno de los cultivos más importantes, dentro de los sistemas de producción, así como uno de los elementos básicos de la dieta de la población rural (Yáñez *et al.*, 2007). Un factor limitante para su producción, es la escases de nitrógeno en el suelo, para solucionar este inconveniente normalmente se aplica urea (Yáñez *et al.*, 2007), en caso de no tener un manejo adecuado, se obtiene como consecuencia pérdidas de nitrógeno, principalmente en forma de NO_3 y NH_4 por lixiviación y volatilización respectivamente, también producidas por desnitrificación (N_2O , NO), que fuera del sistema suelo-planta, pueden causar daños al hombre, los peces, los animales domésticos y en general al medio ambiente (Urquiaga y Zapata, 2000).

Ante la necesidad de aplicar nuevas tecnologías amigables con el medio ambiente y basándose en la capacidad simbiótica y de producción de metabolitos de ciertos microorganismos, se han realizado estudios a nivel nacional e internacional que confirman la efectividad del uso de *Azospirillum* como fijador de nitrógeno en el suelo y productor de fitohormonas que estimulan el crecimiento de varios cultivos, obteniendo como resultado un incremento significativo en el rendimiento.

El Programa de Maíz del INIAP-EESC, cuenta con nueve cepas identificadas fenotípicamente (Espinoza, 2004) las mismas que fueron evaluadas en diferentes variedades de maíz en invernadero y campo, obteniéndose como resultado la no especificidad de las mismas y una buena adaptabilidad en el cultivo de maíz (Yáñez *et al.*, 2004). Se determinó que al inocular los cultivos con la cepa proveniente de la provincia de Bolívar se alcanza un rendimiento promedio de 3371.05 kg/ha mientras que en el testigo, sin inocular, se alcanzó un rendimiento de 2121.6 kg/ha. Por otra parte, al aplicar el fertilizante químico al 50% en asociación con la cepa procedente de Bolívar en la variedad de maíz INIAP-102, incrementó el rendimiento de 4000 kg/ha (con 100% fertilización química) a 4167.4 kg/ha, desde el punto de vista económico, esta aplicación tiene una tasa beneficio/costo de 2.67, que es la alternativa más rentable para la producción del cultivo de maíz (Molina, 2006).

Para la producción y aplicación del biofertilizante, es necesario, un medio que brinde protección y requerimientos nutricionales a la bacteria durante el almacenamiento, para posteriormente inocularla en campo, es así que, en el año 2010, se realizó la evaluación de soportes sólidos y líquidos durante seis meses de almacenamiento y la evaluación de cuatro métodos de inoculación: líquido al suelo y a la semilla; y sólido al suelo y a la semilla, en dos sectores de la serranía, de éstas investigaciones se recomendó emplear Mezcla de Turba de Chimborazo + 1% CaCO₃ + 3% raíz de maíz como soporte sólido y solución de melaza al 2% para la producción del biofertilizante líquido, siendo la aplicación a la semilla el método de inoculación más eficiente para la cepa C2-Bolívar.

6.3 Justificación

Los cultivos de maíz, arroz, sorgo, trigo y caña de azúcar, por su importancia económica a nivel mundial, han sido objeto de estudio en los últimos años, y se ha venido evaluando la aplicación de bacterias asimbióticas diazotróficas como *Azospirillum* spp. asociadas a éstas especies vegetales, obteniéndose resultados favorables a nivel nacional e internacional.

Para facilitar la producción y distribución de ésta bacteria como biofertilizante aplicable al cultivo de maíz en la sierra ecuatoriana, es necesario validar el producto, garantizando al agricultor la efectividad de la cepa, incluso, al finalizar su tiempo máximo de almacenamiento (180 días). Ofreciendo un producto con inóculo suficiente para la planta, de fácil manejo para el agricultor y amigable con el ecosistema. Por tal motivo es importante evaluar en el cultivo de maíz la efectividad del biofertilizante en dos presentaciones: sólido y líquido, en complemento con tres tipos de fertilización, de ésta manera ofrecer al productor una alternativa para complementar la nutrición del sistema suelo-planta, evitando el uso indiscriminado de fertilizantes químicos y de esta manera mantener la capa cultivable del suelo obteniendo beneficios de costo y rendimiento.

6.4 Objetivos

6.4.1 General

- Evaluar la efectividad de un biofertilizante sólido y líquido a base de *Azospirillum* spp. en el cultivo de maíz (*Zea mays* L.) variedad INIAP 124, en complemento con

tres tipos de fertilización en la localidad de Pichincha, Sección Oriental de la EESC.

6.4.2 Específicos

- Analizar las características que presenta el cultivo de maíz tratado con diferente fertilización.
- Evaluar el efecto de la aplicación de un biofertilizante sólido y líquido a base de *Azospirillum* spp. en el cultivo de maíz (*Zea mays* L.) variedad INIAP 124.
- Evaluar la adaptabilidad de las cepa C2-Bolívar en la rizósfera del cultivo de maíz (*Zea mays* L.) proveniente del biofertilizante sólido y líquido.
- Seleccionar el mejor tipo de fertilización que complemente la acción del biofertilizante sólido y/o líquido.
- Realizar un análisis económico de acuerdo a presupuesto parcial y tasa marginal de retorno.

6.5 Análisis de Factibilidad

El estudio que se propone se hace factible, puesto que representa beneficios de tipo tecnológico, ambiental, social y económico, puesto que, al realizarse esta investigación se logrará validar un biofertilizante a base de cepas nativas de *Azospirillum* spp. aplicable al cultivo de maíz, el cual representa una nueva alternativa tecnológica que ofrece al agricultor un producto garantizado, amigable con el ecosistema, que mejorará el rendimiento de sus cosechas con una menor inversión logrando así, elevar la calidad de vida de los productores maiceros de la serranía ecuatoriana. A continuación se indican los valores económicos de la propuesta.

Tabla N.5. Valores Económicos de la Propuesta

	INIAP	Graduando
<u>Recursos Humanos</u>		
Graduando	\$ 2914	
Jornal		\$ 470
<u>Recursos Físicos</u>		
Materiales, equipos, reactivos, insumos y material de oficina	\$ 2700	
<u>Recursos Económicos</u>		
Transporte	\$250	
Improvistos		\$326
Publicaciones	\$200	
Subtotal	\$ 6064	\$ 796
TOTAL		\$ 6860

Elaborado por: Yolanda Pallo Barona

6.6 Fundamentación

6.6.1 Biofertilizantes

Los biofertilizantes microbianos pueden definirse como productos a base de microorganismos que viven normalmente en el suelo, aunque en poblaciones bajas, y que, al incrementar sus poblaciones por medio de la inoculación artificial, son capaces de poner a disposición de las plantas, mediante su actividad biológica, una parte importante de los nutrientes que necesitan para su desarrollo, así como de suministrar sustancias hormonales o promotoras del crecimiento. En un sentido amplio, estos términos pueden usarse también para incluir todos los recursos orgánicos necesarios para el desarrollo de las plantas, los cuales son transformados mediante la acción de los microorganismos (bacterias, algas azul verdosas, hongos, algas y protozoos). La importancia de los biofertilizantes radica en su capacidad para suplementar o movilizar nutrientes con un mínimo uso de recursos no renovables; además, tiene la ventaja de que los procesos microbianos son rápidos y pueden aplicarse en pequeñas unidades para solucionar problemas locales específicos (Martínez R., *et al.*, 1999).

6.6.2 Mecanismos de estimulación del crecimiento de las plantas

La capacidad de *Azospirillum* para estimular el crecimiento de las plantas ha sido demostrada en decenas de experimentos, tanto de campo como de invernadero. Varios

son los mecanismos que se han sugerido como responsables del efecto estimulador observado en las plantas inoculadas.

En numerosos estudios de inoculación con *Azospirillum*, además del mejor crecimiento de las plantas, fueron observados incrementos en el contenido de nitrógeno total de las plantas inoculadas respecto a los testigos y en la incorporación de ¹⁵N. No obstante, en la mayoría de estos estudios no fueron observadas diferencias significativas en el porcentaje de nitrógeno o en el contenido de proteína entre plantas inoculadas y no inoculadas, razón que contribuyó a desechar la idea de que la fijación biológica de nitrógeno fuera el mecanismo responsable de los efectos benéficos observados. Debido a que los efectos de la inoculación con *Azospirillum* sobre el crecimiento de la raíz y la parte aérea de las plantas son similares a los que se presentan cuando las plantas son tratadas con fitohormonas fue sugerido que estas sustancias podrían ser responsables del mejor crecimiento de las plantas, así como de los incrementos observados en el contenido de minerales y en el rendimiento de los cultivos (Bashan, Y. y Levanony, H. 1990).

Recientemente ha sido revisada la función de las fitohormonas en las asociaciones planta-microorganismo. *Azospirillum* tiene la capacidad de producir auxinas, citocininas y giberelinas en medios de cultivo. No obstante, el mecanismo analizado con mayor amplitud ha sido la producción de auxinas, especialmente la del ácido indolacético (AIA). El AIA producido por las bacterias puede modificar el contenido de fitohormonas de las plantas conduciendo a la estimulación del crecimiento de las mismas (Thuler, D., et al., 2003).

La producción de auxinas por *Azospirillum* spp., se cree que juega un mejor rol al promover el crecimiento vegetal, aunque pequeñas evidencias en plantas, han sido publicadas en los últimos años, que *Azospirillum* spp., produce altas cantidades de AIA extracelular, sin embargo, altas concentraciones de suspensión bacteriana, inhibe la elongación de las raíces (Khawas, M. y Adachi, K., 1999).

En cultivos de *Azospirillum*, además de AIA se han encontrado otros compuestos indólicos y metabolitos relacionados tales como el ácido indol pirúvico, indol láctico, indol acetamida, indol acetaldehído, indol etanol e indol metanol, triptamina, antranilato y otros compuestos indólicos no identificados (Caballero J., 2001).

Actualmente se conoce que *Azospirillum* puede sintetizar AIA a través de tres vías. En Actualmente se conoce que *Azospirillum* puede sintetizar AIA a través de tres vías. En tanto que las vías del ácido indol pirúvico y la del indol acetamida son dependientes del triptofano, la tercera es una vía independiente de este aminoácido, desconociéndose el precursor del AIA. Resultados recientes permiten sugerir que la indol piruvato descarboxilasa es una enzima común tanto a la vía del indol pirúvico como a la vía no dependiente de triptofano (Caballero J., 2001).

El efecto benéfico de *Azospirillum* spp., consiste en la producción de giberelinas. La aplicación de giberelinas tiene efectos similares a los que presenta *Azospirillum* spp., en el incremento de los pelos radicales, altura de planta y reducción de procesos fisiológicos (Piccoli P. *et al.*, 1997).

El efecto del potencial de agua (concentración de O₂) sobre el crecimiento y producción de giberelinas A3, indicó que utilizan agua en un 50% para producir células con capacidad de producir altas cantidades de agua, formar resistencia a la sequía y ayudar a la formación del fruto con buen tamaño. Esto indica, un incremento en la cantidad de giberelinas A3 producidas dentro de la planta por *Azospirillum* spp., que actúan en la inducción de crecimiento de las plantas y la resistencia a la sequía en el cultivo de maíz (Piccoli P. *et al.*, 1997).

Durante las fases de crecimiento vegetal, la producción de etileno es mínima. El etileno juega un papel importante en la germinación de las semillas, la bacteria *Azospirillum* produce cantidades de etileno suficientes para romper la latencia de la semilla (Holguin G., y Glick B., 2003).

6.7 Metodología. Modelo operativo

Tabla N.6. Modelo Operativo (Plan de acción)

Fases	Metas	Actividades	Responsable	Recursos	Presupuesto	Tiempo
1. Formulación de la propuesta	Plantear una investigación que contribuya a la validación de un biofertilizante de <i>Azospirillum</i> spp. aplicable al cultivo de maíz.	-Investigación bibliográfica -Redacción del documento	Investigador	Humanos Técnicos Económicos	\$330	1 mes
2. Desarrollo preliminar de la propuesta	Planificar actividades para evitar inconvenientes en el desarrollo experimental.	-Asegurarse de contar con cantidad suficiente de biofertilizante sólido y líquido con seis meses de almacenamiento -Adquisición de insumos materiales y equipos necesarios para la investigación.	Investigador	Humanos Técnicos Económicos	\$2800	1 mes
3. Implementación de la propuesta	Ejecución de la propuesta	-Labores preculturales -Comprobación de concentración de biofertilizantes a los seis meses de almacenamiento. -Siembra y aplicación en campo del biofertilizante sólido y líquido en complemento con tres tipos de fertilización.	Investigador	Humanos Técnicos Económicos	\$800	1 mes
4. Evaluación de la propuesta	Comprobar la efectividad del biofertilizante sólido y líquido.	-Cuidado del cultivo -Cosecha -Toma de datos y tabulación -Análisis de resultados.	Investigador	Humanos Técnicos Económicos	\$2900	6 meses

Elaborado por: Yolanda Pallo Barona

6.8 Administración

Tabla N.7. Administración de la Propuesta

Características a mejorar	Situación actual	Resultados esperados	Actividades	Responsables
Biodiversidad microbiana del suelo.	-Limitada población de microorganismos benéficos	-Aumentar la población de <i>Azospirillum</i> spp. como microorganismo productor de fitohormonas de crecimiento y fijador de nitrógeno atmosférico.	-Cuantificación de <i>Azospirillum</i> spp. antes de la inoculación y después del ciclo de cultivo.	
Fijación biológica de Nitrógeno atmosférico en el suelo	-Uso excesivo de fertilización química	-Reducción o eliminación de fertilización química	-Evaluación inicial y final de nitrógeno en el suelo y final en la plata. -Evaluación de características de plantas de maíz con cada tipo de fertilización.	-Graduando -Técnicos del programa de Maíz del INIAP-EESC
Rendimiento en el cultivo de maíz	-Bajo rendimiento en el cultivo de maíz	-Aumento del rendimiento en el cultivo de maíz	-Evaluación del rendimiento en choclo	
Nivel económico de productores maiceros	-Baja rentabilidad para los productores maiceros	-Incremento en la rentabilidad del cultivo de maíz para los productores.	-Análisis de presupuesto parcial y tasa de retorno marginal.	

Elaborado por: Yolanda Pallo Barona

6.9 Previsión de la Evaluación

Tabla N.8. Previsión de la Evaluación

Preguntas Básicas	Explicación
¿Quiénes solicitan evaluar?	-Técnicos del Programa de Maíz de la EESC del INIAP -Productores maiceros de la sierra ecuatoriana.
¿Por qué evaluar?	-Es necesario validar la efectividad del biofertilizante sólido y líquido a base de <i>Azospirillum</i> spp. aplicable al cultivo de maíz.
¿Para qué evaluar?	-Ofrecer al productor maicero un biofertilizante garantizado, que le permita elevar el rendimiento de sus cosechas, mejorar su calidad de vida, practicando una agricultura sostenible.
¿Qué evaluar?	-Características agromorfológicas del maíz. -Rendimiento en choclo -Población inicial y final de <i>Azospirillum</i> spp. en el suelo. -Nitrógeno total inicial y final en suelo y únicamente final en la planta.
¿Quién evalúa?	-Técnicos del Programa de Maíz de la EESC del INIAP -Egresado/a de Carreras a fines a la Agrobiotecnología.
¿Cuándo evaluar?	-Las características agromorfológicas se deben evaluar durante el ciclo de cultivo del maíz. -El rendimiento se evalúa luego de la cosecha en choclo. -La población de <i>Azospirillum</i> spp. y el porcentaje de nitrógeno en el suelo se evalúa al inicio y al final del ciclo de cultivo y el porcentaje de nitrógeno en planta únicamente al final.
¿Cómo evaluar?	-Las características agromorfológicas y rendimiento del maíz se evalúan a través de métodos de evaluación agronómica. -La población de <i>Azospirillum</i> spp. se evalúa a través de análisis microbiológicos. -El contenido de nitrógeno en suelo y planta se evalúa a través de métodos químico.
¿Con qué evaluar?	-Observación directa. -Técnicas microbiológicas con medios de cultivo específicos. -Reactivos para determinación de nitrógeno total.

Elaborado por: Yolanda Pallo Barona

MATERIAL DE REFERENCIA

Bibliografía:

- ALCÁNTAR, G., ALMARAZ, J., DÍAZ, P. y FERRERA, R. 1998. Inoculación de bacterias promotoras de crecimiento en lechuga. *Terra*. 19: 333-335.
- ASAMBLEA CONSTITUYENTE. 2009. Constitución de la República del Ecuador. Quito-Ecuador. Pp.24, 181,182.
- BACA, B. 2002. Líneas de investigación: Bioquímica y Biología Molecular de la interacción microorganismo-planta (en línea). Puebla, MX. Instituto de Ciencias. Consultado 13 mar. 2010. Disponible en <http://www.buap.mx/investigacion/icuap/area.htm>
- BASHAN, Y., y LEVANONY, H. 1990. Current status of *Azospirillum* inoculation thecnology: *Azospirillum* as a challenge for agriculture. *Microbiology*. Pp 591 - 608.
- BASHAN, Y. 1997. Aplicaciones Biotecnológicas en Ecología Microbiana. Cundinamarca, CO. Pontificia Universidad Javeriana – Centro de Investigaciones Biológicas del Noreste. Pp. 1 - 3
- BASHAN, Y. 1998. Inoculants of growth-Promoting Bacteria for use in Agriculture. Department of Microbiology, Division of Experimental Biology. The Center for Biological Research of the Northwest. México. Pp. 1 - 3
- BODDEY, R. y DOBEREINER, J. 1988. Nitrogen fixation associated with grasses and cereals: recent results and perspectives for future research. *Plant.Soil*. P. 55
- BURDMAN, S., OKON, Y. y JURKEVITCH, E. 2000. Surface characteristics of *Azospirillum brasilense* in relation to cell aggregation and attachment to plant roots. *Crit. Rev. Microbiol*. P. 26.
- CABALLERO, J. 1998. El género *Azospirillum* (en línea). Cuernavaca, MX, Universidad Nacional Autonoma de México UNAM. Consultado 25 de Marzo del 2009. Disponible <http://bibliooweb.dgsca.unam.mx/libros/microbios /cap10>

- CABALLERO, J. 2001. Estudio de la distribución y la diversidad genética de algunas especies de diazotrofos. México DF, MX. snt. P. 2.
- CARRILLO, L. 2003. Microbiología agrícola. Consultado el 15 de Noviembre del 2010. Disponible en www.unsa.edu.ar/matbib/micragri/micagricap2.pdf
- CHANWAY C. 1997. Inoculation of tree roots with plant growth promoting rhizobacteria: An emerging technology for reforestation. For. Sci. P. 110
- CIAT. 1988. Manual de métodos de evaluación, selección y manejo. Simbiosis leguminosa – *Rhizobium*. Proyecto Especial CIAT- UNDP. Capitulo 11. P. 42
- Diario El Universal. 2008. Bacteria como biofertilizante. México DF. Consultado el 18 de enero del 2010. Disponible en <http://www.elsiglodetorreon.com.mx/noticia/367792.usan-bacteria-como-biofertilizante.html>
- DÍAZ A. y MAYEK N., 2008. La biofertilización como tecnología sostenible. Editorial Plaza Valdés. Tamaulipas-México, P. 180
- DÖBEREINER, J., MARRIEL, I. y NERY, M. 1976. Ecological distribution of *Spirillum lipoferum* Beijerinck. Canadian Journal of Microbiology. 22: 1464.
- ESPINOZA, L. 2004. Caracterización y selección de la bacteria diazotrófica *Azospirillum* spp., asociado con el maíz de altura (*Zea mays* L). INIAP. Tesis Ingeniero. Agrónomo. pg. 47- 90.
- ESTRADA, G., 2008, . Calidad de inoculantes almacenados a diferentes temperaturas: efecto sobre la población, humedad y pH del producto. Tesis Microbiólogo Industrial. Pontificia Universidad Javeriana, Facultad de Ciencias, Carrera de Microbiología industrial. P. 44
- FALLICK, E., OKON, Y. y FISCHER, M. 1988. Growth response of maize roots to *Azospirillum* inoculation. Effect of soil organic matter content, number of rhizosphere bacteria and timing of inoculation. Soil Biol Biochem. Pp.25-49.

- FALLICK, E. y Y. OKON. 1996. Inoculants of *Azospirillum brasilense*: Biomass production, survival and growth promotion of *Setaria italica* and *Zea mays*. Soil Biol. Biochem Pp. 123-126.
- FERLINI, H. y DÍAZ S. 2006. Inoculación de *Azospirillum brasilense* en el cultivo de maíz (*Zea mays* L.). Santa Fé – Argentina. Consultado el 16 de Febrero del 2010. Disponible en http://www.engormix.com/inoculacion_con_azopirillum_brasilense_s_articulos_1159.AGR.htm
- GALAL, Y., EL-GHANDOUR, S. ALY, S. SOLIMAN, A. y GADALLA, Y. 2000. Non-isotopic method for the quantification of biological nitrogen fixation and wheat production under field conditions. Biol Fertil Soil 32:47-51.
- GAMAZO, C., LOPEZ-GOÑI I. Y DIAZ R. 2005, Manual práctico de Microbiología, 3ra. Edición, editorial MASSON S.A., Barcelona España, P. 49
- GARCÍA, I. 2008. Análisis del mercado de fertilizantes en España en el contexto de la agricultura actual. Artículos Horizonte N. 426. Agronegocios. Estrategia de Fertilización. España. Consultado el 10 de Enero del 2010. Disponible en www.freshplaza.es/news_detail.asp?id=15341
- GIRARD, H. y ROUGIEX, R. 1964. Técnica de Microbiología Agrícola. Zaragoza – España. P.27. P. 244.
- HOLGUIN, G. y GLICK, B. 2003. Transformation of *Azospirillum brasilense* with ACC diaminase gene from *Enterobacter cloacae* fused to the gene promoter improves the fitness and plant growth promoting ability. Microbiology. Pp. 122 – 133.
- INSTITUTO COLOMBIANO AGROPECUARIO (ICA). 2006. Manual de buenas prácticas de distribución y manejo para insumos agropecuarios. Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural. Bogotá. P.15
- ISO 10390. Soil quality-Determination of pH,2005

- KHAWAS, M., y ADACHI, K., 1999. Identification and cuantification of auxins in the cultura media of *Azospirillum* and *klebsiella* and their effect on rice roots. Fertility Soils. p. 377 – 381.
- LABANDERA, C., VITOTA, G., CANZANI, F., SORIA, S. y DUTTO, P., 2000. Aislamiento y caracterización de microorganismos fijadores de nitrógeno en plantas de avena y arroz. En: Memorias del 8^{vo} Simposio Internacional de Fijación Biológica de Nitrógeno en no Leguminosas. Sydney, Australia. Pp. 3 - 22.
- MADIGAN, M., MARTINKO, J. y PARKER, J. 2000. Brock Biología de los Microorganismos. Octava Edición, Prentice Hall. Madrid – España. Pp. 174 - 175, 702
- MARTÍNEZ, R., TOLEDO, N., ARGUELLES, C. 1999. Introducción al conocimiento de los biofertilizantes. Universidad Tecnológica de la Huasteca Hidalguense, México. P.43.
- MENDEZ, M. 2008. Nitrógeno Biológico en Arroz; Argentina; P 41. Consultado el 13 de enero del 2010. Disponible en: mmendez@corrientes.inta.gov.ar
- MEZA, L. 2010. El Paradigma positivista y la concepción dialéctica del conocimiento. Instituto Tecnológico de Costa Rica. Disponible en: <http://www.cidse.iter.ac.cr/revistamate/ContribucionesV4n22003/meza/pag1html>
- MILANO, E. 2007. Qué son los Biofertilizantes y cómo nos pueden beneficiar. Ministerio del Poder Popular para la Agricultura y Tierras. Publicación gratuita. Gobierno Bolivariano de Venezuela. P. 5
- MILIÁN, A y LABANDERA C. 2001. Calidad de inoculantes comerciales para leguminosas en Uruguay 1993 – 2001. Consultado el 27 de Febrero del 2010. Disponible en <http://www.Chasque.apc.org:8081/microlab/LMSCI/trate/calinoc.htm>.
- MISHRA, B. 2000. Quality control of biofertilizers and organic manures. Department of Soil Science and Agricultural Chemistry. Birsa Agricultural University. Ranchi-834006, India. Consultado en Marzo del 2011. Disponible en

<http://www.sameti.org/ORGANICFARMING/Quality%20control%20bioferts-1.pdf>

- MOLINA S. 2006. Desarrollo de un biofertilizante a partir de cepas de *Azospirillum* spp. para el cultivo de maíz (*Zea mays* L.) variedad INIAP-102 con dos fertilizaciones químicas y dos fertilizaciones orgánicas. Tesis Ingeniero Agrónomo. Universidad Técnica de Cotopaxi, Ciencias Agrícolas, Ambientales y Veterinarias, Ingeniería Agronómica. Quito-Ecuador. pp. 36 a 38.
- MORTIMER, P., STOLP, H., TRÜPER, H. y BALOWS, A., SCHLEGEL, H. 1981. The Prokariotes. A handbook on habitats, isolation, and identification of bacteria. New York, US. Springer-Verlag Berlin Heidelberg. v. 1, Pp. 796-808.
- NARANJO, M. y NARANJO, J. 2003. Contabilidad de Costos. 2da. Edición. Quito – Ecuador. Pp. 13 – 14.
- NOCETI, J. 2000. Biofertilizantes - Un nuevo desafío en nuestro país y en la región; Uruguay, Pp. 2-5
- NOVO, R. 2002. Memorias curso internacional de microbiología del suelo, los biofertilizantes y la biofertilización. Quito - Ecuador. ASOINCO.
- OKON, Y. e ITZIGSOHN, R. 1992. Poli- β -hidroxybutyrate metabolism in *Azospirillum brasilense* and the becological role of PHB in the rhizosphere. *FEMS Microbiology Reviews*. P. 131.
- OKON, Y. y GONZALES, L. 1994. Agronomic applications of *Azospirillum*: An evaluationof 20 years worldwide field inoculation. *Soil Biol. Biochem.* 26: 1592
- PEOPLES, M. y CRASWELL, M. 1992. Biological Nitrogen Fixation: Investments, expectations and actual contributions to Agriculture. *Plant and Soil* 141: 13 – 39.
- PEREA, E. 2008. Enfrentan agricultores altos precios de fertilizantes. La Imagen Agropecuaria. Consultado el 19 de enero del 2010. Disponible en http://www.imagenagropecuaria.com/articulos.php?id_art=406&id_sec=25
- PÉREZ, A.; VELÁZQUEZ J. y HERNÁNDEZ H. 2002. Inmovilización de *Lactococcus lactis* en Capsulas de Alginato; Universidad Juárez Autónoma de Tabasco –

División Académica de Ciencias Agropecuarias; Tabasco - México D.F. pp. 316 – 317.

PERTICARI, A. 2006. Especial inoculación; Convenio de Asistencia Técnica INTA-25. Buenos Aires – Argentina; Consultado el 12 de febrero del 2010. Disponible en <http://www.lanacion.com.ar/nota>.

PICCOLI, P., LUCANGELI, C., ACHNEIDER, G., BOTTINI, R. 1997. Hydrolysis of gibberellins to glucoside by *Azospirillum lipoferum* culture in a nitrogen free biotin based chemically defined medium. Plant Growth Regulator. Pp. 179 – 182.

PISABARRO, A., 2009. Microbiología general. Pp. 20-23 Consultado el 18 de Diciembre del 2010. Disponible en:
http://www.unavarra.es/genmic/microgral/02_cultivo%20microorganismos%20MG%2008-09.pdf

PRIMAVERSI, A. 1982. Manejo ecológico del suelo. snt. P. 499

REDVET. 2007. La dinámica bacteriana desde el punto de vista biofísico. Vol. VII. N°9. Consultado el 2 de Febrero del 2011. Disponible en :
<http://www.veterinaria.org/revistas/redvet/n090907/090708.pdf>

RODRÍGUEZ, D. MUÑOZ, R. CORNEJO, J. y ESPINOZA, C. 2004. Microbiología ambiental. P. 4. Consultado el 3 de Marzo del 2010. Disponible en
https://www.ucursos.cl/ingenieria/2009/1/CI41B/1/material_docente/bajar?id_material=223016.

RODRÍGUEZ, E. y CÁCERES A. 1982. Improved médium for isolation of *Azospirillum* spp., *Applieta Microbiology and Environmental*. 44(2): 940-991.

SAURA, G.; 2000. Uso de *Azospirillum* sp. en caña de azúcar; FIAGRO; Buenos Aires – Argentina.

STEPHENS, J., Rask, H. 2000. Inoculant production and formulation. *Field Crops Res.*, P.65.

- STEUGBING, L., GODOY, R. y ALBERDI M. 2001. Métodos de Ecología Vegetal. Editorial Universitaria. Santiago de Chile. P. 121.
- THULER, D., NADRO, W., BARBOSA, H. 2003. Plant growth regulator and amino acids released by *Azospirillum* spp. In chemicals defined media. Microbiology. P. 174
- URQUIAGA, S. y ZAPATA, F. 2000. Manejo eficiente de la fertilización nitrogenada de cultivos anuales en América Latina y el Caribe. Editorial Génesis Porto Alegre Río Grande do Sul, Brasil, Pp 110.
- VANDE BROEK, A., DOBBELAERE, S., VAN DOMMELEN, A. 2000. *Azospirillum* plant interactions: signaling and metabolic interactions. Pp. 671.
- VARELA, G. y GROTIUZ, G. 2002. Fisiología y metabolismo bacteriano. P. 50.
Consultado el 10 de Diciembre del 2010. Disponible en
<http://www.higiene.edu.uy/cefa/2008/FisiologiayMetabolismoBacteriano.pdf>
- VILLAVERDE, M. FERNÁNDEZ, A. NICOLÁS, J. MALO, J. STREINTENBERGER, S. GARCÍA GÓMEZ, A. GARCÍA GIL, A. y MARTÍNEZ, P. 2006. Nuevo fertilizante biológico y procedimiento de obtención. Oficina española de patentes y marcas. Madrid-España. Pp 4-5
- WILLEY, J., SHERWOOD, L., WOOLVERTON C., 2008. Microbiología de Prescott, Harley y Klein. Séptima Edición. McGrawHill. Nueva York-EEUU. PP. 123-126.
- YÁNEZ, C.; ZAMBRANO, J.; CAICEDO, M.; SÁNCHEZ, H.; HEREDIA, J. 2003. Catálogo de Recursos Genéticos de Maíces de Altura Ecuatorianos (Programa de Maíz. EESC-INIAP, Quito, Ecuador.) P. 2.
- YÁNEZ, C., ZAMBRANO, J., CAICEDO, M., SÁNCHEZ, H. y HEREDIA, J. 2004. Informe Técnico Final del Proyecto IQ-CV_102, Programa de Maíz. Estación Experimental Santa Catalina; INIAP, Quito, Ecuador. Pp. 41-49
- YÁNEZ, C. 2007. Manual de Producción de Maíz para pequeños agricultores y agricultoras, Proyecto de Emergencia para la Rehabilitación Agroproductiva de la Sierra del Ecuador FAO/TCP/ECU/3101(E). Quito – Ecuador. P. 13

ZUBERER, D. 1990. Soil rhizosphere aspects of N₂-fixing plant-microbe associations.
En: the Rhizosphere (J.M. Lynch. Ed.). John Wiley and sons Ed. Nueva York. P.
319.

ANEXO A

Medios de cultivo

Anexo A-1 Medio de Aislamiento y Purificación Ácido Málico – Rojo Congo sólido (Rodríguez y Cáceres, 1982)

Reactivos	Cantidad
Ácido Málico	5 g
MgSO ₄ 7H ₂ O	0.2 g
K ₂ HPO ₄	0.5 g
NaCl	0.1 g
FeCl ₃ 6H ₂ O	0.015 g
KOH	4.8 g
Extracto de Levadura	0.5 g
Solución Rojo – Congo	15 ml
Agar	15 g
Agua Destilada	985 ml
pH	7.0

Solución Rojo – Congo

Reactivos	Cantidad
Agua destilada	400 ml
Rojo – Congo	1 g

Anexo A-2. Medio de Reactivación Peptona al 1% (CIAT, 1988)

Reactivos	Cantidad
Peptona	1 g
Agua destilada	100 ml

Anexo A-3. Medio de Fermentación Caldo Nutritivo (Girard y Rougieux, 1964)

Reactivos	Cantidad
Extracto de carne	3 g
Peptona Bacteriana	2 g
Cloruro de Sodio	5 g
Agua destilada	1000 ml
pH	7.1

Anexo A-4. Medio semisólido NFB (Nitrogen Fixation Biological)
(Döbereiner, J; Marriell, I; Nery, M., 1976)

Reactivos	Cantidad
Agua destilada	1000 ml
Ácido málico	5.0 g
KH ₂ PO ₄	0.4 g
K ₂ HPO ₄	0.1 g
MgSO ₄ . 7 H ₂ O	0.2 g
NaCl	0.1 g
CaCl ₂	0.02 g
FeCl ₃	0.01 g
Na ₂ Mo O ₄ . 2 H ₂ O	0.002 g
Azul de Bromotimol (0.5% [wt/vol] C ₂ H ₅ OH solución)	5 ml
Agar	1.75 g
pH	6.8

ANEXO B

Metodología de Pruebas Bioquímicas

Anexo B-1. Tinción de Gram y forma celular

Es la tinción diferencial más comúnmente empleada en bacteriología. Permite la separación de bacterias en dos grandes grupos: bacterias gram-positivas y gram-negativas, atendiendo a su distinta composición de la pared celular.

Reactivos:

Colorante cristal violeta

- Solución A: Cristal violeta , 20 g
 Etanol (95%), 200 ml
- Solución B: Oxalato amónico, 8 g
 Agua destilada, 800 ml

Solución de lugol

- Iodo resublimado, 1 g
IK, 2 g
Agua destilada hasta 300 ml

Solución de safranina

- Solución de safranina en etanol (95%), 10 ml
Agua destilada, 90 ml

Preparación:

Preparar una extensión de células sobre un porta y fijar a la llama de un mechero Bunsen. Teñir la extensión con la solución de cristal violeta durante 1-2 minutos, retirar el exceso de colorante con agua destilada y aplicar durante 1 minuto la solución de lugol (ésta fija el colorante a la bacteria). Lavar con agua destilada y decolorar con alcohol de 96°. Lavar con agua destilada, y aplicar el colorante de contraste (safranina) durante 30

segundos. Finalmente lavar con agua destilada. Una vez seca la placa, observar al microscopio.

Las bacterias gram-positivas aparecen de color violeta, mientras que las gram-negativas se tiñen de rosa (Espinoza, 2004).

Anexo B-2. Presencia de la enzima catalasa

Para comprobar si un cultivo microbiano posee catalasa o no, se mezcla sobre un portaobjetos una colonia tomada de la superficie del cultivo sólido con agua oxigenada al 3%. La aparición de burbujas indican la presencia de catalasa (Madigan *et al.*, 2000).

Anexo B-3. Prueba de motilidad

Reactivos:

Extracto de carne, 3 g

Peptona, 10 g

NaCl, 5 g

Agar, 4 g

Agua destilada 1000 ml

Disolver los componentes por calentamiento hasta ebullición, ajustando previamente el pH a 7. Distribuir en tubos (10 ml/tubo) y esterilizar en autoclave a 121 °C durante 15 minutos. Inocular por punción los 5 mm superiores del medio y realizar observaciones macroscópicas a las 6, 24 y 48 horas. Si la cepa a analizar es móvil se observará crecimiento radial desde la zona de inoculación hacia las paredes del tubo (Espinoza, 2004).

Anexo B-4. Fijación de Nitrógeno

Preparar el Medio de Enriquecimiento para *Azospirillum* spp. (Döbereiner, J; Marriel, I; Nery, M., 1976).

Reactivos:

Ácido málico, 5 g

KH₂PO₄, 0.4 g

K_2HPO_4 , 0.1 g

$MgSO_4 \cdot 7 H_2O$, 0.2 g

Na Cl, 0.1 g

$CaCl_2$, 0.02 g

$FeCl_3$, 0.01 g

$Na_2MoO_4 \cdot 2 H_2O$, 0.002 g

Azul de Bromotimol, 5 ml

Extracto de levadura, 0.5 g

Agar-Agar, 12 g

Agua destilada, 1000 ml

Mezclar todos los componentes y estabilizar el pH a 6.8, esterilizar por 15 minutos a 121°C a 15 psi. Dispensar en cajas petri. Una vez solidificado el medio, realizar estriado compuesto a partir de las colonias que se encuentran en medio Ácido málico-rojo congo. Incubar por 8 días a 32°C. El viraje de coloración de verde a azul indica un resultado positivo.

Anexo B-5. Tinción de gránulos de poli-β-hidroxibutirato (PHB)

Para esta prueba se utilizaron cultivos de 24 y 48 horas incubados a 35 °C en NFB semisólido. La tinción de gránulos de PHB se realizó siguiendo el procedimiento propuesto por Bradshaw, 1976, el cual se describe a continuación:

1. Preparar un frotis del velo en un portaobjetos limpio. Secarlo al aire y fijarlo a la llama.
2. Cubrir el portaobjetos con negro Sudán B y dejar reaccionar por no menos de 10 minutos. Eliminar el exceso de colorante y secar colocando una tira de papel secante sobre el frotis hasta que todo el colorante se absorba. Evitar mover o restregar el papel durante el secado. Levantar el papel con cuidado.

3. Lavar el frotis con unas gotas de xilol para eliminar el exceso de colorante y volver a secar con papel secante.
4. Contra teñir con safranina acuosa al 5% m/v durante 10 a 15 segundos. Lavar inmediatamente con agua de tubo y dejar secar al aire.
5. En el microscopio y con el objetivo de inmersión examinar la preparación para detectar las partículas, las cuales aparecerán de color azul o negro en contraste con el rojo del citoplasma.

Solución de Negro Sudán.

Negro Sudan B 0,3 g

Etanol (95 %) 75 ml

Disolver el negro Sudan B en el etanol. Agregar 25 ml de agua destilada y mezclar (Gamazo, C., Lopez-Goñi I. y Diaz R., 2005).

ANEXO C

Preparación de inoculantes sólidos y líquidos

Anexo C-1. Prueba de concentración de suspensión bacteriana utilizada para soportes sólidos

Dilución	Concentración (UFC.ml ⁻¹)					Promedio (UFC.ml ⁻¹)
	R1	R2	R3	R4	R5	
1x10⁻⁶	1.08x10 ⁹	1.05x10 ⁹	0.97x10 ⁹	1.12x10 ⁹	0.98x10 ⁹	1.06 x10 ⁹
1x10⁻⁷	1.1x10 ⁹	1.3x10 ⁹	0.9x10 ⁹	1.3x10 ⁹	0.8x10 ⁹	1.08 x10 ⁹

Volumen de inoculación en caja petri = 100 µl

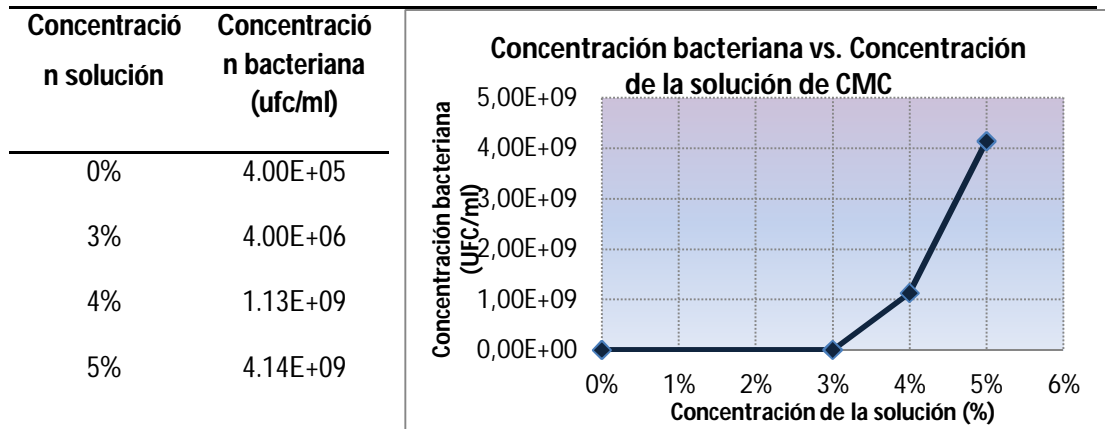
Anexo C-2. Volumen de suspensión bacteriana inoculado en cada bolsa con 30 ml de soporte sólido

Soportes	Peso (g)	Volumen Inoculado (ml)
t1: Turba de Chimborazo	23.9	9.6
t2: Mezcla	22.5	9.0
t3: Turba con vermiculita	8.9	3.6
t4: Humus de lombriz	24.7	9.9
t5: Zeolita	22.8	9.1

Anexo C-3. Preparación de suspensión Alginato de sodio/Células bacterianas

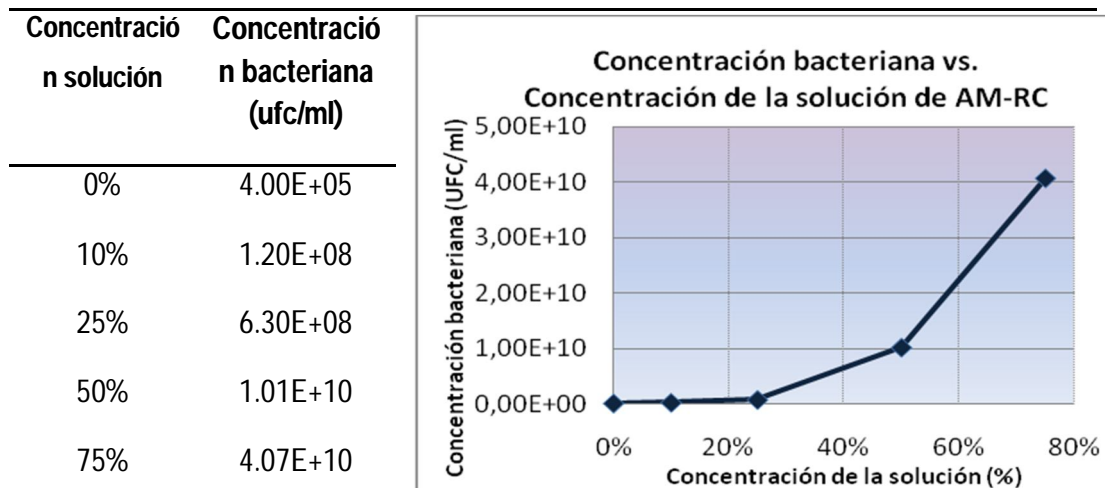
Para la Inmovilización de células se preparó 720 ml de Alginato de Sodio al 2%, se esterilizó a 121°C a 15psi durante 15 minutos, una vez que se encontró a temperatura ambiente se adicionó 75 ml de la suspensión bacteriana con una concentración de 1x10⁸ UFC/ml, de tal manera que se obtuvo una concentración de 1x10⁷ UFC/ml.

Anexo C-4. Concentración bacteriana vs. Concentración de solución de Carboximetilcelulosa.



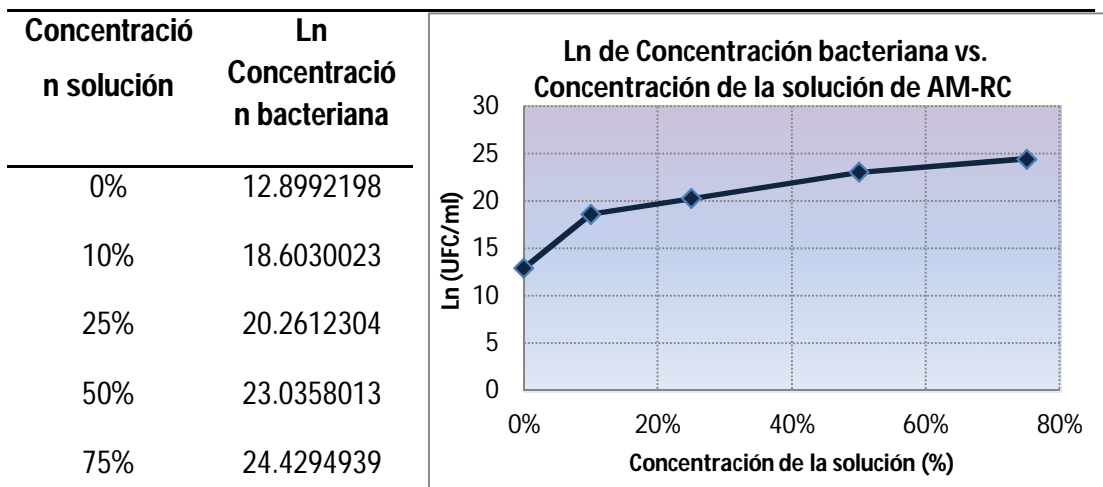
Concentración seleccionada: 5%

Anexo C-5. Concentración bacteriana vs. Concentración de solución de Medio Ácido málico-rojo congo



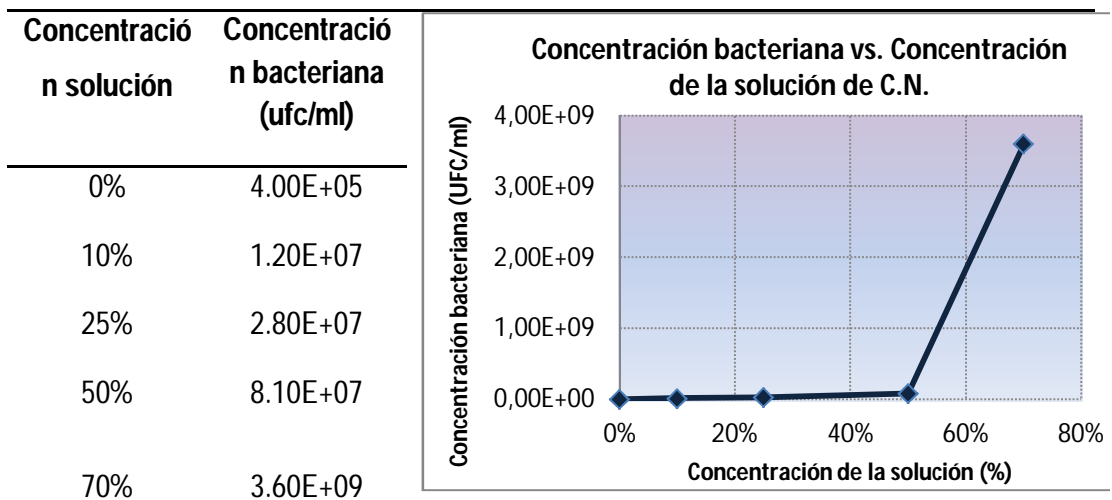
No es posible seleccionar una concentración en base a ésta gráfica, es necesario transformar los datos a Ln de la concentración bacteriana.

Anexo C-6. Ln de la Concentración bacteriana vs. Concentración de solución de Medio Ácido málico-rojo congo



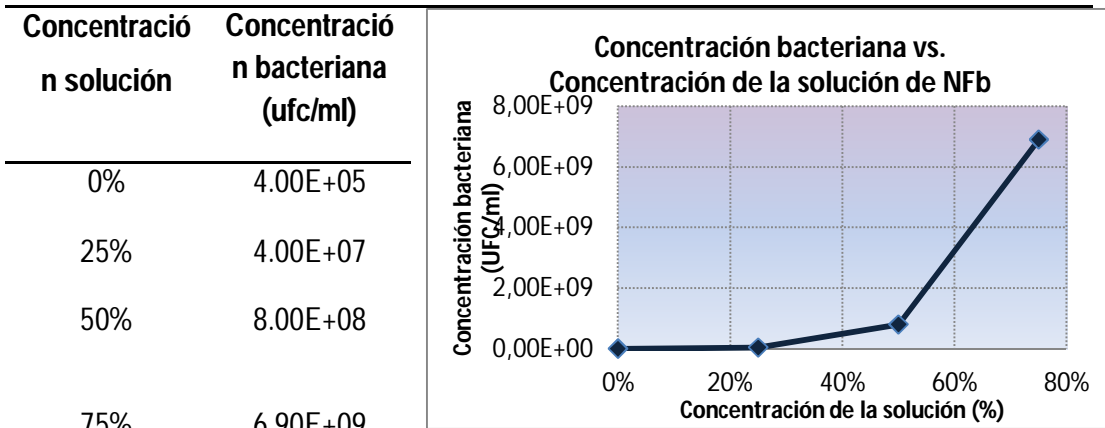
De acuerdo a la gráfica, la concentración seleccionada es al 35%, puesto que, está en función a $\pm 22,00$, que es el logaritmo natural correspondiente a una concentración bacteriana entre $3,6 \times 10^9 - 5,0 \times 10^9$ UFC.ml⁻¹.

Anexo C-7. Concentración bacteriana vs. Concentración de solución de Caldo nutritivo



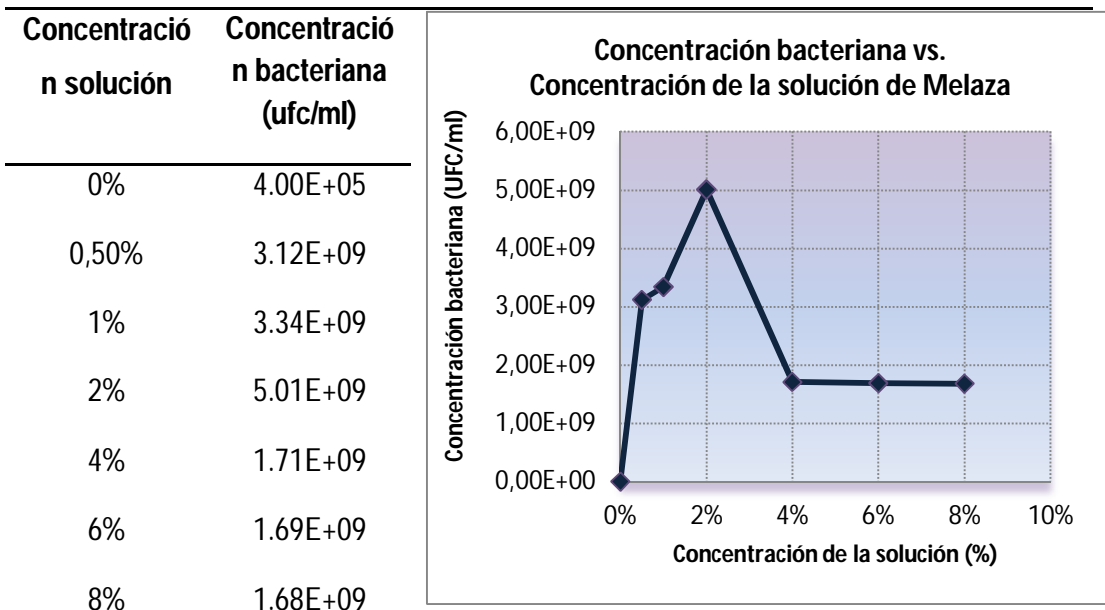
Concentración seleccionada: 70%

Anexo C-8. Concentración bacteriana vs. Concentración de solución de medio NFB



Concentración seleccionada: 70%

Anexo C-9. Concentración bacteriana vs. Concentración de solución de melaza



Concentración seleccionada: 2%

Anexo C-10. Análisis de minerales totales, nitrógeno total y pH del Biofertilizante comercial NoctinAzo

mg/100ml					µg/100ml			%	
Ca	P	Mg	K	Na	Cu	Fe	Mn	N	pH
1.39	11.52	1.89	32.19	17.67	3	225	213	0.04	5.31

Análisis realizado en el departamento de nutrición y calidad del Instituto Nacional Autónomo de Investigaciones Agropecuarias (INIAP), Estación Experimental Santa Catalina

Anexo C-11. Preparación de solución de Carboximetilcelulosa al 5%

Reactivos	Cantidad
Carboximetilcelulosa	50 g.
Agua destilada	1000 ml
pH	7.00

Anexo C-12. Preparación de solución de Ácido Málico-Rojo Congo al 35%

Reactivos	Cantidad
Ácido Málico	1.75 g
MgSO ₄ 7H ₂ O	0.07 g
K ₂ HPO ₄	0.175 g
NaCl	0.035 g
FeCl ₃ 6H ₂ O	0.00525 g
KOH	1.68 g
Extracto de Levadura	0.175 g
Solución Rojo Congo	5.25 ml
Agua Destilada	994.75 ml
pH	7.00

Anexo C-13. Preparación de solución de Caldo nutritivo al 70%

Reactivos	Cantidad
Extracto de carne	2.1 g
Peptona Bacteriana	1.4 g
NaCl	3.5 g
Agua destilada	1000 ml
pH	7.00

Anexo C-14. Preparación de solución de medio NFB al 70%

Reactivos	Cantidad
Ácido Málico	3.5 g
MgSO ₄ . 7H ₂ O	0.14 g
K ₂ HPO ₄	0.35 g
CaCl ₂	0.014 g
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	0.0014 g
MnSO ₄	0.007 g
FeCl ₃ . 6H ₂ O	0.007 g
Biotina	0.007 g
Azul de bromotimol	2.1 ml
Agua destilada	1000 ml
pH	7.00

Anexo C-15. Preparación de solución de melaza al 2%

Reactivos	Cantidad
Melaza	20 ml
Agua destilada	980 ml
pH	7.00

Anexo C-16. Preparación de solución aproximada a biofertilizante comercial

Reactivos	Cantidad
CaCl ₂	0.041 g
K ₂ HPO ₄	1.15 g
MgSO ₄ . 7H ₂ O	0.16 g
NaCl	0.36 g
FeCl ₃ . 6H ₂ O	0.006 g
Ácido Málico	1.40 g
Agua destilada	800 ml
pH	7.00

**Anexo C-17. Concentración / suspensión bacteriana utilizada para soportes
líquidos**

Dilución	Concentración (UFC.ml⁻¹)					Promedio (UFC.ml⁻¹)
	R1	R2	R3	R4	R5	
1x10 ⁻⁶	9.7x10 ⁸	1.13x10 ⁹	8.8x10 ⁸	1.9x10 ⁹	1.11x10 ⁹	1.056 x10 ⁹
1x10 ⁻⁷	1.1x10 ⁹	8x10 ⁸	9x10 ⁸	1.4x10 ⁹	7x10 ⁸	0.98 x10 ⁸

Volumen de inoculación en caja petri = 100µl

ANEXO D

Resultados

Tabla D-1. Caracterización inicial de material empleado para soportes sólidos

Soportes	pH	g/100g						ppm					%		
		N	P	K	Ca	Mg	S	B	Zn	Cu	Fe	Mn	M.O	Arena	Arcilla
T. Chimborazo	4.6	0.94	0.07	0.04	0.9	0.16	0.19	27.8	16.3	15.9	6354.4	35	23.7	50	2
Mezcla	5.2	0.79	0.06	0.13	1.6	0.14	0.23	29.3	17.5	28.8	5679.0	30.1	27.1	52	4
Turba vermiculita	6.4	1.15	0.13	0.65	3.21	2.36	0.11	52.5	97.7	52.6	8864.7	217.2	74.5	82	4
Humus de lombriz	6.9	1.01	0.27	0.47	6.32	0.41	0.18	36.1	88.8	36.6	6964.5	428.0	28.5	54	6
Zeolita	8.5	0.14	0.05	0.10	3.40	0.45	0.01	33.9	20.9	50.0	21966.0	507.8	0	20	30

Análisis realizado en el Laboratorio de manejo de suelos y aguas del Instituto Nacional Autónomo de Investigaciones Agropecuarias (INIAP), Estación Experimental Santa Catalina.

Tabla D-2. Análisis inicial de minerales totales (0 días de almacenamiento)

Tratamientos	*M.O	CONCENTRACIÓN DE MINERALES (ppm)									
		NT	P	K	Ca	Mg	Fe	Cu	Zn	Mn	
*t1	43,29	1,18	0,03	0,02	0,20	0,03	3799,50	8,99	53,8	<2	
									0	5	
*t2	44,5	1,40	0,03	0,02	0,50	0,02	2180,50	10,1	9,30	<2	
								7		5	
*t3	82,49	0,79	0,07	0,97	2,01	1,57	6662,33	21,1	96,3	<2	
								0	5	5	
*t4	56,95	1,12	0,27	0,17	5,43	0,20	2462,50	44,5	60,3	<2	
								0	5	5	
*t5	23,97	0,44	0,01	0,07	0,58	0,35	10090,5	51,1	37,9	<2	
								0	0	5	
*t7		0,02	<50	<25		<50	<25	<50	<25	<2	
					<50					5	
*t8		0,03	<50	12,6		<50	<25	<50	<25	<2	
				0	<50					5	
*t9		0,04	<50	0,01		<50	<25	<50	<25	<2	
					<50					5	
*t10		0,02	51,50	0,02	<50	0,00	<25	<50	<25	<2	
						5				5	
*t11		0,04	<50	0,19	0,02	0,01	<25	<50	<25	<2	
										5	
*t12		0,00	173,0	0,05	<50	0,00	<25	<50	<25	<2	
		2	0			2				5	

*t1: Turba de Chimborazo; *t2: Mezcla; *t3: Turba con vermiculita; *t4: Humus de lombriz; t5: Zeolita liofilizada; t7: Solución de Carboximetilcelulosa 5%; *t8: Solución de Medio Ácido málico-rojo congo 35%; *t9: Solución de Caldo Nutritivo 70%; *t10: Solución de Medio NFB 70%; *t11: Solución de melaza 2%; t12: Solución aproximada a biofertilizante comercial. *M.O: Porcentaje de materia orgánica.

Análisis realizado en los Laboratorios de la Agencia Ecuatoriana de Aseguramiento de la Calidad del Agro. (Agrocalidad).

Tabla D-3. Análisis final de minerales totales (180 días de almacenamiento)

Tratamiento	*M.O	CONCENTRACIÓN DE MINERALES (ppm)								
		NT	P	K	Ca	Mg	Fe	Cu	Zn	Mn
*t1	44,2	1,2	0,03	0,0	0,30	0,04	4491,00	15,4	25,0	<2
	2	5		4				5	0	5
*t2	42,3	0,4	42,82	2,6	25,9	10,2	3404,29	38,6	34,6	<2
	2	1		8	7	8		3	8	5
*t3	76,4	0,8	0,08	1,0	2,23	2,17	9071,33	23,5	77,7	<2
	9	6		5				0	3	5
*t4	42,4	1,2	0,21	0,2	6,10	0,27	3093,10	45,9	76,2	<2
	0	5		0				0	0	5
*t5	4,97	0,5	0,01	0,1	0,70	0,32	18043,5	2,35	<25	<2
		1		0			0			5
*t7		0,0	<50	<25	<50	<50	<25	<50	<25	<2
		2								5
*t8		0,0	<50	0,1	<50	0,00	<25	<50	<25	<2
		3		5						5
*t9		0,1	<50	0,0	<50	<50	<25	<50	<25	<2
		0		1						5
*t10		0,0	51,55	0,0	<50	0,00	<25	<50	<25	<2
		9		1		1				5
*t11		0,0	<50	0,1	0,01	0,01	<25	<50	<25	<2
		8		4						5
*t12		0,0	176,3	0,0	<50	0,00	<25	<50	<25	<2
		4	0	6		2				5

*t1: Turba de Chimborazo; *t2: Mezcla; *t3: Turba con vermiculita; *t4: Humus de lombriz; t5: Zeolita liofilizada; t7: Solución de Carboximetilcelulosa 5%; *t8: Solución de Medio Ácido málico-rojo congo 35%; *t9: Solución de Caldo Nutritivo 70%; *t10: Solución de Medio NFB 70%; *t11: Solución de melaza 2%; t12: Solución aproximada a biofertilizante comercial. *M.O: Porcentaje de materia orgánica

Análisis realizado en los Laboratorios de la Agencia Ecuatoriana de Aseguramiento de la Calidad del Agro. (Agrocalidad)

Tabla D-4. Concentración de *Azospirillum* spp. (UFC.g⁻¹) en soportes sólidos durante 180 días de almacenamiento

Soportes sólidos	0 días	45 días	90 días	135 días	180 días
t1: Turba de Chimborazo	1.54x10 ¹⁰	3.41x10 ¹⁰	5.60x10 ⁸	1.00x10 ⁷	9.60x10 ⁵
t2: Mezcla	1.00x10 ⁹	6.40x10 ⁸	6.40x10 ⁸	3.62x10 ⁸	3.20x10 ⁷
t3: Turba vermiculita	4.40x10 ⁸	9.68x10 ⁹	1.74x10 ⁹	7.64x10 ⁸	5.52x10 ⁸
t4: Humus de lombriz	2.42x10 ⁹	3.61x10 ¹⁰	2.00x10 ⁷	1.40x10 ⁷	1.00x10 ⁷
t5: Zeolita	9.80x10 ⁸	4.20x10 ⁸	2.20x10 ⁷	1.12x10 ⁷	1.06x10 ⁷
t6: Perlas de alginato	3.00x10 ⁸	2.20x10 ⁹	1.12x10 ⁸	9.00x10 ⁷	6.00x10 ⁷

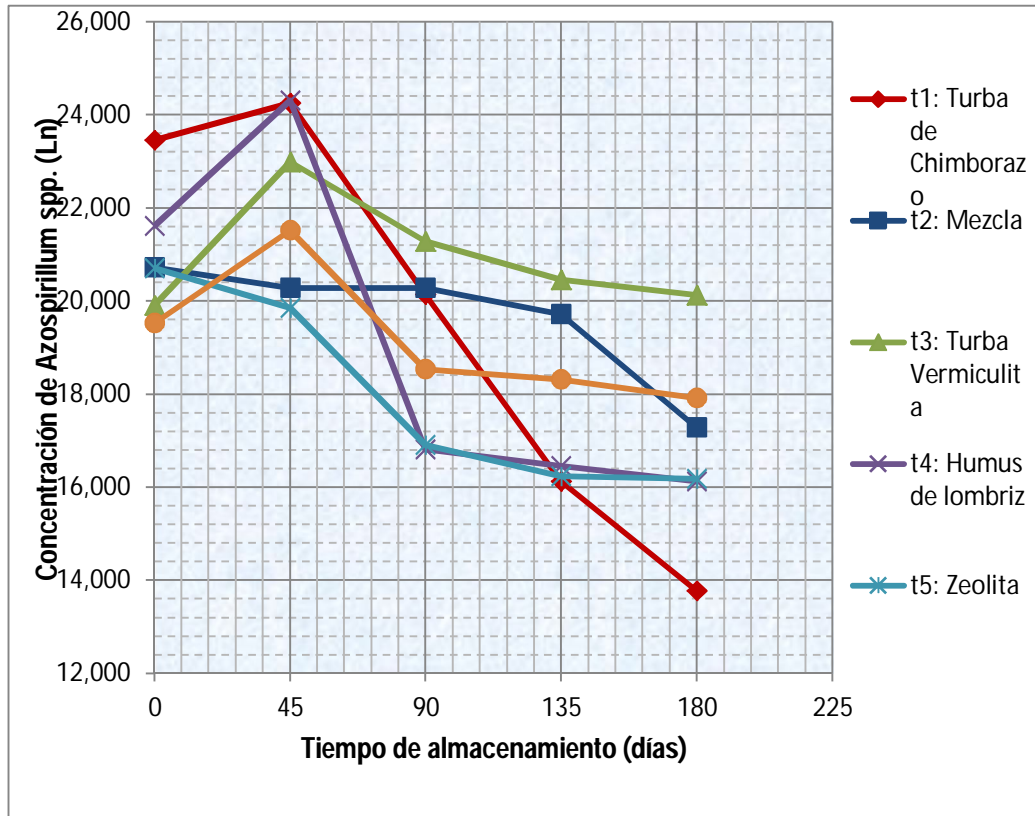


Figura D-1. Gráfico de las curvas de crecimiento de cepa C2-Bolívar de *Azospirillum* spp. en soportes sólidos durante seis meses de almacenamiento.

Tabla D-5. Ln de la Concentración de *Azospirillum* spp. (Ln UFC.g⁻¹) en soportes sólidos durante 180 días de almacenamiento

Soportes sólidos	0 días	45 días	90 días	135 días	180 días
t1: Turba de Chimborazo	23.455	24.253	20.143	16.118	13.775
t2: Mezcla	20.723	20.277	20.277	19.707	17.281
t3: Turba vermiculita	19.902	22.993	21.277	20.454	20.129
t4: Humus de lombriz	21.607	24.310	16.811	16.455	16.118
t5: Zeolita	20.703	19.856	16.907	16.231	16.176
t6: Perlas de alginato	19.519	21.512	18.534	18.315	17.910

Tabla D-6. Concentración de *Azospirillum* spp. (UFC.ml⁻¹) en soportes líquidos durante 180 días de almacenamiento

Soportes líquidos	0 días	45 días	90 días	135 días	180 días
t7: Sol. CMC	3.56x10 ¹⁰	2.80x10 ⁸	1.02x10 ⁸	1.00x10 ⁸	6.60x10 ⁷
t8: Sol. Ác. Málico-Rojo Congo	4.53x10 ¹⁰	3.60x10 ⁸	6.60x10 ⁷	6.40x10 ⁷	2.40x10 ⁷
t9: Sol. Caldo nutritivo	3.96x10 ⁹	4.80x10 ⁷	4.60x10 ⁷	4.40x10 ⁷	3.00x10 ⁷
t10: Sol. NFB	2.20x10 ⁸	1.56x10 ⁹	2.60x10 ⁸	2.56x10 ⁸	1.60x10 ⁸
t11: Sol. Melaza	3.00x10 ⁸	2.40x10 ⁹	4.80x10 ⁸	3.84x10 ⁸	3.86x10 ⁸
t12: Sol. Aprox. Biof Comercial	3.60x10 ⁹	3.54x10 ⁹	6.80x10 ⁷	6.80x10 ⁷	4.60x10 ⁷

Tabla D-7. Ln de la Concentración de *Azospirillum* spp. en soportes líquidos durante 180 días de almacenamiento

Soportes líquidos	0 días	45 días	90 días	135 días	180 días
t7: Sol. CMC	24.296	19.450	18.440	18.421	18.005
t8: Sol. Ác. Málico-Rojo Congo	24.536	19.702	18.005	17.974	16.994
t9: Sol. Caldo nutritivo	22.100	17.687	17.644	17.600	17.217
t10: Sol. NFB	19.209	21.168	19.376	19.361	18.891
t11: Sol. Melaza	19.519	21.599	19.989	19.766	19.771
t12: Sol. Aprox. Biof Comercial	22.004	21.987	18.035	18.035	17.644

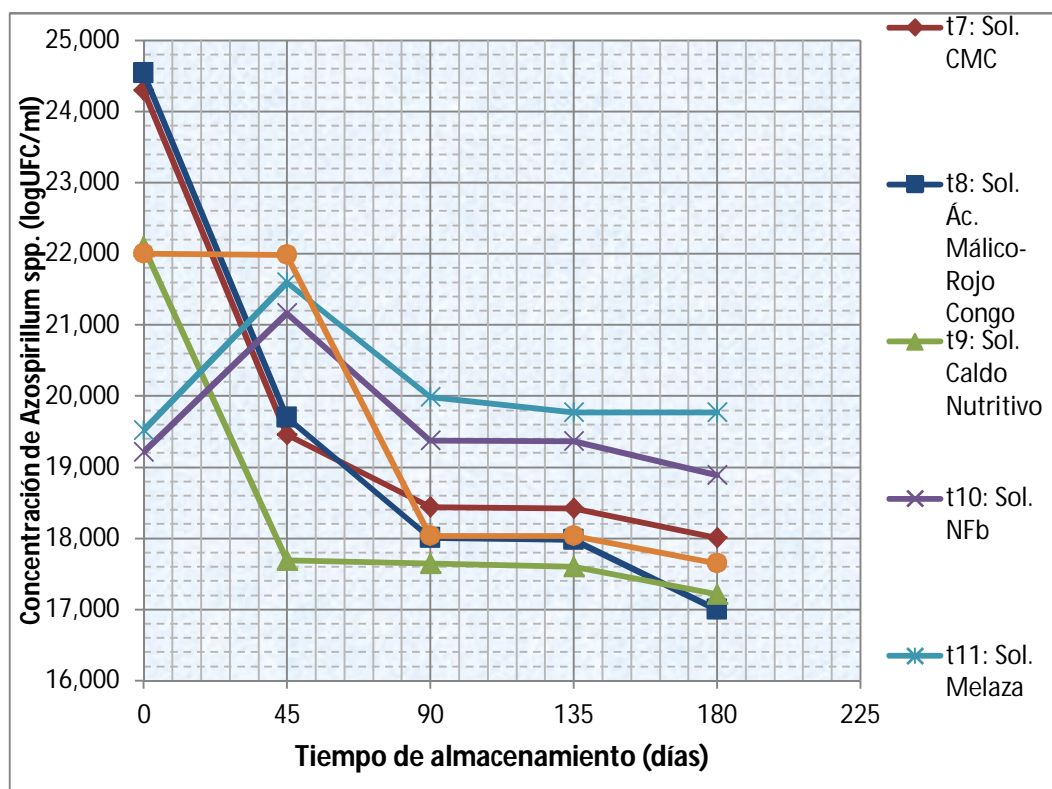


Figura D-2. Gráfico de las curvas de crecimiento de cepa C2-Bolívar de *Azospirillum* spp. en soportes líquidos durante seis meses de almacenamiento

Tabla D-8. Resultados de la cinética del desarrollo bacteriano en soportes sólidos

Soportes sólidos	Tasa de crecimiento (μ =día ⁻¹)	# de generaciones (g)	Tiempo de generación (T=día)	Tasa de muerte (k=día ⁻¹)
t1: Turba/Chimborazo	0.0177	1.1514	39.0815	-0.0834
t2: Mezcla	0	0	0	-0.0307
t3: Turba vermiculita	0.0687	4.4594	10.0910	-0.0251
t4: Humus de lombriz	0.0601	3.8997	11.5393	-0.0859
t5: Zeolita	0	0	0	-0.0308
t6: Perlas de alginato	0.0443	2.8745	15.6551	-0.0366

Tabla D-9. Resultados de la cinética del desarrollo bacteriano en soportes líquidos

Soportes líquidos	Tasa de crecimiento (μ =día ⁻¹)	# de generaciones (g)	Tiempo de generación (T=día)	Tasa de muerte (k=día ⁻¹)
t7: Sol. CMC	0	0	0	-0,0592
t8: Sol. Ác. Mál.-Rojo Congo	0	0	0	-0,0659
t9: Sol. Caldo nutritivo	0	0	0	-0,0508
t10: Sol. NFB	0,0435	2,8260	15,9237	-0,0187
t11: Sol. Melaza	0,0462	3	15	-0,0191
t12: Sol. Aprox. Bio. Comerc.	0	0	0	-0,0308

Tabla D-10. Promedio de pHs de cada tratamiento sólido y líquido durante 180 días de almacenamiento

Tratamientos	Tiempo de almacenamiento				
	0 días	45 días	90 días	135 días	180 días
t1: Turba de Chimborazo	4,35	4,30	4,27	4,20	4,35
t2: Mezcla	6,22	6,18	5,96	6,09	6,17
t3: Turba con vermiculita	6,46	6,57	6,60	6,45	6,63
t4: Humus de lombriz	7,25	7,53	7,73	7,53	7,49
t5: Zeolita liofilizada	7,88	7,66	7,61	7,56	7,55
t6: Perlas de Alginato	6,89	6,68	6,56	6,54	6,60
t7: Sol. CMC al 5%	6,41	6,51	6,44	6,26	6,23
t8: Sol. Medio AM-RC 35%	8,28	8,11	7,69	7,64	7,35
t9: Sol. Caldo nutritivo 70%	7,74	7,68	7,49	7,42	7,41
t10: Sol. NFB 70%	8,19	8,17	8,03	7,69	7,67
t11: Sol. Melaza 2%	4,16	4,06	4,17	4,05	3,98
t12: Sol. Aprox. Biofert. com.	7,02	7,00	6,93	6,93	6,75

Tabla D-11. Promedio de porcentaje de materia orgánica de cada tratamiento sólido durante 180 días de almacenamiento

Tratamientos	Tiempo de almacenamiento				
	0 días	45 días	90 días	135 días	180 días
t1: Turba de Chimborazo	49,33	48,95	48,84	47,38	47,69
t2: Mezcla	48,46	47,76	47,76	47,69	47,67
t3: Turba con vermiculita	84,81	84,48	84,49	84,50	84,44
t4: Humus de lombriz	54,57	54,01	53,80	53,59	53,58
t5: Zeolita liofilizada	9,54	9,36	9,30	9,41	9,39

Tabla D-12. Pruebas Bioquímicas realizadas a Posibles *Azospirillum*

Pruebas Bioquímicas	Posibles <i>Azospirillum</i> spp. (PA)				
	PA1	PA2	PA3	PA4	PA5
Tinción de gram	-	-	-	-	-
Forma celular	Bacilar	Bacilar	Bacilar	Bacilar	Bacilar
Motilidad	+	+	+	+	+
Fijación de Nitrógeno	+	+	+	+	+
Presencia de Poli- β -hidroxibutirato	+	+	+	+	+

Fuente: Yolanda Pallo. Laboratorio de microbiología de la Facultad de Ciencia e Ingeniería en alimentos de la Universidad Técnica de Ambato.

Tabla D-13. Costos de materia prima directa empleada para la producción de 25 fundas de 30 ml.

Soportes	Cantidad	Unidad	Materia prima directa	Costo unitario (dólares)	Costo total (dólares)	Total (dólares)
Mezcla	2.5	kg	Turba de Chimborazo	0,09	0,225	0,23
	5.7	g	Carbonato de Calcio	0,0003	0,0017	
T. Vermiculita	1	kg	Turba con vermiculita	2.00	2.00	2.00
Humus/lombriz	2.5	kg	Humus de lombriz	0,22	0,55	0.55
Zeolita	0.6	kg	Zeolita	2	1.2	1.2

Perlas de alginato	20	g	Alginato de Sodio	0,14	2,8	3,24
	14,7	g	Cloruro de Calcio	0,03	0,441	
Solución de Medio Ácido Máfico Rojo Congo al 35%	1,4	g	Ácido málico	0,48	0,67200	0,81
	0,14	g	Fosfato de potasio	0,23	0,03220	
	0,056	g	Sulfato de magnesio	0,07	0,00392	
	0,0042	g	Cloruro férrico	0,03	0,00013	
	0,028	g	Cloruro de sodio	0,03	0,00084	
	1,344	g	Hidroxido de potasio	0,025	0,03360	
	0,14	g	Extracto de levadura	0,32	0,04480	
0,0105	g	Rojo-congo	2	0,02100		
Solución de Caldo Nutritivo al 70%	1,68	g	Extracto de carne	0,48	0,80640	1,26
	1,12	g	Peptona Bacteriana	0,23	0,25760	
	2,8	g	Cloruro de Sodio	0,07	0,19600	
Solución de NFB al 70%	2,8	g	Ácido málico	0,48	1,34400	2,25
	0,28	g	Fosfato de potasio	0,23	0,06440	
	0,112	g	Sulfato de magnesio	0,14	0,01568	
	0,0112	g	Cloruro de calcio	0,03	0,00034	
	0,00112	g	Molibdato de sodio	0,43	0,00048	
	0,0056	g	Sulfato de manganeso	0,08	0,00045	

	0,0056	g	Cloruro férrico	0,09	0,00050	
	0,0056	g	Biotina	120	0,67200	
	0,0084	g	Azul de bromotimol 5%	18	0,15120	
Solución de melaza 2%	16	ml	melaza	0,002	0,032	0,03
	0,041	g	CaCl ₂	0,03	0,00123	
	1,15	g	K ₂ HPO ₄	0,23	0,26450	
Solución aproximada a biofertilizante comercial	0,16	g	MgSO ₄	0,07	0,01120	0,96
	0,36	g	NaCl	0,03	0,01080	
	0,006	g	FeCl ₃	0,03	0,00018	
	0,009	g	MnSO ₄	0,08	0,00072	
	1,4	g	Ácido málico	0,48	0,67200	

Tabla D-14. Costos de mano de obra directa para la producción de 25 fundas (30 ml c/u) por tratamiento sólido y líquido

Tratamientos	Tiempo (h) /mes	Costo de mano de obra de cada tratamiento
*t2 y *t4	20	22.00
*t3	29	31.90
*t5	16	17.60
*t6	17	18.7
*t7 - *t12	8	8.80

*t2 y *t4: Mezcla y Humus de lombriz; *t3: Turba con vermiculita; *t5: Zeolita liofilizada; *t6: Perlas de Alginato; *t7 - *t12: Solución de Carboximetilcelulosa 5%; Solución de medio ácido málico-rojo congo 35%; Solución de Caldo Nutritivo 70%; Solución de NFB 70%; Solución de melaza 2% y Solución aproximada a biofertilizante comercial.

Sueldo de 1 técnico de producción al mes: 264 dólares
Horas de trabajo al mes: 240 horas

Tabla D-15. Costos indirectos de fabricación: Reactivos empleados en la producción de 25 fundas (30 ml c/u) por cada tratamiento sólido y líquido

Cantidad	Unidad	Rea	Costo unitario	Costo total
-----------------	---------------	------------	-----------------------	--------------------

1,725	g	Ácido málico	0,48	0,828
0,1725	g	Fosfato de potasio	0,23	0,039675
0,069	g	Sulfato de magnesio	0,07	0,00483
0,0052	g	Cloruro férrico	0,03	0,000156
5,175	g	Agar	0,36	1,863
0,6762	g	Cloruro de sodio	0,03	0,020286
1,656	g	Hidroxido de potasio	0,025	0,0414
0,1725	g	Extracto de levadura	0,32	0,0552
0,0129	g	Rojo-congo	2	0,0258
0,0414	g	Extracto de carne	0,34	0,014076
0,276	g	Peptona bacteriana	0,3	0,0828
Total				2,98

Tabla D-16. Costos indirectos de fabricación: Insumos empleados en la producción de 25 fundas (30 ml c/u) por cada tratamiento sólido y líquido

Cantidad	Unidad	Insumos	Costo unitario	Costo total
12	unidades	Cajas Petri descartable	0,12	1,44
84	cm	Papel parafilm	0,008	0,672
20	cm	Papel aluminio	0,001	0,02
2	unidades	Papel toalla	0,037	0,074
50	ml	Alcohol antiséptico	0,002	0,1
200	ml	Alcohol industrial	0,002	0,4
1	unidad	Fundas plásticas	0,02	0,02
25	unidades	Fundas de aluminio polietileno	0,2	5
9	unidades	Tips para micropipeta	0,01	0,09
2	unidades	Mascarillas tipo médico	1	2
2	unidades	Jeringuillas	0,25	0,5
1	par	Guantes quirurgicos	0,12	0,12
Total				10,44

En el caso del tratamiento de zeolita liofilizada, se adiciona 5.5m de cinta masking con un costo total de 0.13 dólares + 1 pliego de papel filtro con un costo total de 3.00 dólares, obteniéndose un costo de insumos de **13.57 dólares**.

Tabla D-17. Costos indirectos de fabricación: Material de laboratorio empleado en la producción de 25 fundas la tratamiento sólido (t2-t5)

Cantidad	Material de laboratorio	Costo unitario	Costo total	Costo/hora	Horas de trabajo	Costo total
1	Frasco de vidrio autoclavable de 1000ml	7	7	0,0024	1	0,0024
1	Frasco de vidrio autoclavable de 500ml	6	6	0,0021	1,5	0,0031
1	Frasco de vidrio autoclavable de 100ml	5	5	0,0017	25	0,0434
1	Tubo de ensayo de vidrio de 30ml	1	1	0,0003	0,08	0,0000
35	Tubo de ensayo de vidrio de 10ml	1	35	0,0122	1,5	0,0182
1	Vaso de precipitación de 1000ml	6	6	0,0021	0,5	0,0010
1	Vaso de precipitación de 250ml	3	3	0,0010	0,25	0,0003
1	Triangulo de dispersión	1	1	0,0003	0,75	0,0003
1	Lampara de alcohol	4	4	0,0014	4	0,0056
1	Gradilla para tubos de ensayo	9	9	0,0031	1,5	0,0047
1	Caja porta tips	5	5	0,0017	0,5	0,0009
1	Aza de platino	13	13	0,0045	1	0,0045
1	Tijera	3	3	0,0010	0,75	0,0008
1	Bandeja plástica	5	5	0,0017	0,25	0,0004
1	Embudo de cristal	2	2	0,0007	0,1	0,0001
1	Piceta	3	3	0,0010	0,25	0,0003
1	Espátula	7	7	0,0024	1	0,0024
1	Probeta	8	8	0,0028	0,5	0,0014
1	Agitador magnético barra	3	3	0,0010	1	0,0010
Total						0,09
Horas útiles de cada material de laboratorio: 2880 horas						vida útil: 1 año

Tabla D-18. Costos indirectos de fabricación: Material de laboratorio empleado en la producción de 25 fundas (; tratamientos t6 a t12

Cantidad	Material de laboratorio	Costo unitario	Costo total	costo/hora	horas de trabajo	Costo total
1	Frasco de vidrio autoclavable de 1000ml	7	7	0,0024	5	0,0122
1	Frasco de vidrio autoclavable de 500ml	6	6	0,0021	1,5	0,0031
1	Frasco de vidrio autoclavable de 100ml	5	5	0,0017	25	0,0434
35	Tubo de ensayo de vidrio de 10ml	1	35	0,0122	1,5	0,0182
1	Vaso de precipitación de 1000ml	6	6	0,0021	0,5	0,0010
1	Vaso de precipitación de 250ml	3	3	0,0010	0,25	0,0003
1	Triangulo de dispersión	1	1	0,0003	0,75	0,0003
1	Lampara de alcohol	4	4	0,0014	4	0,0056
1	Gradilla para tubos de ensayo	9	9	0,0031	1,5	0,0047
1	Caja porta tips	5	5	0,0017	0,5	0,0009
1	Aza de platino	13	13	0,0045	1	0,0045
1	Tijera	3	3	0,0010	0,1	0,0001
1	Bandeja plástica plana	5	5	0,0017	0,25	0,0004
1	Bandeja plástica profunda	5	5	0,0017	4	0,0069
1	Embudo de cristal	2	2	0,0007	0,1	0,0001
1	Piceta	3	3	0,0010	0,25	0,0003
1	Espátula	7	7	0,0024	2	0,0049
1	Probeta	8	8	0,0028	0,25	0,0007
1	Agitador magnético barra	3	3	0,0010	4	0,0042
Total						0.11

Horas útiles de cada material de laboratorio: 2880 horas

vida útil: 1 año

Tabla D-19. Costos indirectos de fabricación: Equipos empleados en la producción de 25 fundas (30 ml c/u) de cada tratamiento sólido (t2-t6)

Cantidad	Equipos	Costo USD	Horas de trabajo					Costo/hora USD	Costo total				
			t2	t3	t4	t5	t6		t2	t3	t4	t5	t6
1	Autoclave	3700	0,75	0,75	0,75	0,75	0,75	0,13	0,096	0,096	0,096	0,096	0,096
1	Destilador de agua	1560	2	1	2	2	3	0,05	0,108	0,054	0,108	0,108	0,163
1	Cámara de flujo laminar	3000	4	4	4	4	5	0,10	0,417	0,417	0,417	0,417	0,521
1	Sellador de fundas	1600	0,5	0,5	0,5	1	0,5	0,06	0,028	0,028	0,028	0,056	0,028
3	Micropipetas	1420	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,05	0,025	0,025	0,025	0,025	0,025
1	Balanza de precisión	1165	1	1	1	1	1	0,04	0,041	0,040	0,040	0,040	0,040
1	Plato calentador agitador	600	1	1	1	1	1	0,02	0,021	0,021	0,021	0,021	0,021
1	Incubadora	1700	30	30	30	30	30	0,06	1,771	1,771	1,771	1,771	1,771
1	Refrigeradora	1600	16	16	16	17,33	16	0,06	0,889	0,889	0,889	0,963	0,889
1	Agitador bortex	300	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,01	0,005	0,005	0,005	0,005	0,005
1	Medidor de pH	60	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,02	0,010	0,010	0,010	0,010	0,010
1	Agitador orbital	2000	2	2	2	2	2	0,07	0,139	0,139	0,139	0,139	0,139
1	Liofilizador	6500	--	--	--	2	--	0,23	--	--	--	0,451	--
1	Tamiz 180 um	300	10	19	11	11	3	0,01	0,104	0,198	0,115	0,115	0,031
Total									3,66	3,69	3,66	4,22	3,74

Horas útiles de cada equipo: 28800 horas, excepto medidor de pH con 2880 horas útiles

Vida útil: 10años, excepto medidor de pH con 1 año de vida útil.

Tabla D-20. Costos indirectos de fabricación: Equipos empleados en la producción de 25 fundas (30 ml c/u) de cada tratamiento líquido (t7-t12)

Cantidad	Equipos	Costo USD	Horas de trabajo	Costo/hora	Costo total
1	Autoclave	3700	0,75	0,13	0,096
1	Destilador de agua	1560	3	0,05	0,163
1	Cámara de flujo laminar	3000	4	0,10	0,417
1	Sellador de fundas	1600	0,5	0,06	0,028
3	Micropipetas	1420	0,5	0,05	0,025
1	Balanza de precisión	1165	1	0,04	0,041
1	Plato calentador agitador	600	1	0,02	0,021
1	Incubadora	1700	30	0,06	1,771
1	Refrigeradora	1600	16	0,06	0,889
1	Agitador bortex	300	0,5	0,01	0,005
1	Medidor de pH	60	0,5	0,02	0,010
1	Agitador orbital	2000	2	0,07	0,139
Total					3,604

Horas útiles de cada equipo: 28800 horas, excepto medidor de pH con 2880 horas útiles

Vida útil: 10años, excepto medidor de pH con 1 año de vida útil.

Tabla D-21. Costos indirectos de fabricación: Servicios básicos consumidos en la producción de 25 fundas (30 ml c/u) de cada tratamiento sólido y líquido

Cantidad	Unidad	Rubro	Costo unitario	Costo total
0,05	m3	Agua potable	0,37	0,019
20,9	Kw h	Luz eléctrica	0,068	1,421
Total				1,440

En el caso del tratamiento t5: zeolita liofilizada se requiere de 24.9Kw h que equivale a \$1.69 y un costo total de 1.712 dólares

En el caso del tratamiento: t6: perlas de alginato se requiere de 21.9 Kw h que equivale a \$1.49 y un costo total de 1.508 dólares

Tabla D-22. Resumen de costos de producción de tratamientos sólidos que han alcanzado una población bacteriana igual o mayor a 1×10^7 UFC.g⁻¹ a los 180 días de almacenamiento.

Tratamientos	Materia prima directa	Mano de obra directa	Costos indirectos de fabricación						Costo total de 25 fundas de 30ml c/u	Costo / 30ml biofertilizante
			Reactivos	Insumos	Material/laboratorio	Equipos	Servicios básicos	Esterilizació n/ soportes		
t2	0.23	22.00	2.98	10.44	0.09	3.65	1.44	0.31	41.13	1.65
t3	2.00	31.90	2.98	10.44	0.09	3.69	1.44	0.135	52.67	2.11
t4	0.55	22.00	2.98	10.44	0.09	3.66	1.44	0.31	41.49	1.66
t5	1.20	17.60	2.98	13.57	0.09	4.22	1.71	0.31	41.68	1.67
t6	3.24	18.70	2.98	10.44	0.11	3.74	1.51		40.71	1.63

Tabla D-23. Resumen de costos de producción de tratamientos líquidos que han alcanzado una población bacteriana igual o mayor a 1×10^7 UFC.ml⁻¹ a los 180 días de almacenamiento.

Tratamientos	Materia prima directa	Mano de obra directa	Costos indirectos de fabricación					Costo total de 25 fundas de 30ml c/u	Costo / 30ml biofertilizante
			Reactivos	Insumos	Material/laboratorio	Equipos	Servicios básicos		
t7	12.00	8.80	2.98	10.44	0.11	3.60	1.44	39.37	1.57
t8	0.81	8.80	2.98	10.44	0.11	3.60	1.44	28.17	1.13
t9	1.26	8.80	2.98	10.44	0.11	3.60	1.44	28.63	1.15
t10	2.25	8.80	2.98	10.44	0.11	3.60	1.44	29.62	1.18
t11	0.03	8.80	2.98	10.44	0.11	3.60	1.44	27.40	1.10
t12	0.96	8.80	2.98	10.44	0.11	3.60	1.44	28.33	1.13

ANEXO E

Análisis estadísticos

Tabla E-1. Análisis de varianza para la concentración de *Azospirillum* spp. en tratamientos sólidos a los 0 días de almacenamiento

Fuente de variación	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Cuadrados medios	Razón de Varianza (Fc)	Probabilidad
Tratamientos	49.20	5	9.84	60.71	< 0,0001
Error	3.89	24	0,16		
Total	53.09	29			

Tabla E-2. Análisis de varianza para la concentración de *Azospirillum* spp. en tratamientos sólidos a los 45 días de almacenamiento

Fuente de variación	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Cuadrados medios	Razón de varianza	Probabilidad
Tratamientos	105.23	5	21.05	90.36	< 0,0001
Error	5.59	24	0.23		
Total	110.82	29			

Tabla E-3. Análisis de varianza para la concentración de *Azospirillum* spp. en tratamientos sólidos a los 90 días de almacenamiento

Fuente de variación	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Cuadrados medios	Razón de varianza	Probabilidad
Tratamientos	87.55	5	17.51	47.49	< 0,0001
Error	8.85	24	0.37		
Total	96.40	29			

Tabla E-4. Análisis de varianza para la concentración de *Azospirillum* spp. en tratamientos sólidos a los 135 días de almacenamiento

Fuente de variación	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Cuadrados medios	Razón de varianza	Probabilidad
Tratamientos	90.38	5	18.08	99.68	< 0,0001
Error	4.35	24	0.18		
Total	94.74	29			

Tabla E-5. Análisis de varianza para la concentración de *Azospirillum* spp. en tratamientos sólidos a los 180 días de almacenamiento

Fuente de variación	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Cuadrados medios	Razón de varianza	Probabilidad
Tratamientos	112.73	5	22.55	264.39	< 0,0001
Error	2.05	24	0.09		
Total	114.77	29			

Tabla E-6. Resumen del Análisis de varianza para la sobrevivencia de *Azospirillum* spp. en tratamientos sólidos a los 0, 45, 90, 135 y 180 días de almacenamiento en el estudio: "Evaluación de soportes sólidos y líquidos para la producción de un biofertilizante a base de *Azospirillum* spp. aplicable al cultivo de maíz (*Zea mays* L.)"

Fuente de variación	Grados de libertad	Cuadrados Medios y Significancia				
		0 días	45 días	90 días	135 días	180 días
Tratamientos	5	9.84 **	21.05**	17.51**	18.08**	22.55**
Error	24	0.16	0.23	0.37	0.18	0.09
Total	29					
Coefficiente de variación (%)		1.92	2.19	3.23	2.39	1.73

** = Altamente Significativo al 1%.

Tabla E-7. Promedios y Tukey al 5% para la sobrevivencia de *Azospirillum* spp. en tratamientos sólidos a los 0, 45, 90, 135 y 180 días de almacenamiento en el estudio: "Evaluación de soportes sólidos y líquidos para la producción de un biofertilizante a base de *Azospirillum* spp. aplicable al cultivo de maíz (*Zea mays* L.)"

PROMEDIOS Y RANGOS DE SIGNIFICACIÓN DE TUKEY AL 5%										
Tratamientos	Sobrevivencia 0 días de almacenamiento		Sobrevivencia 45 días de almacenamiento		Sobrevivencia 90 días de almacenamiento		Sobrevivencia 135 días de almacenamiento		Sobrevivencia 180 días de almacenamiento	
	Real (UFC.g ⁻¹)	Ln (UFC.g ⁻¹)	Real (UFC.g ⁻¹)	Ln (UFC.g ⁻¹)	Real (UFC.g ⁻¹)	Ln (UFC.g ⁻¹)	Real (UFC.g ⁻¹)	Ln (UFC.g ⁻¹)	Real (UFC.g ⁻¹)	Ln (UFC.g ⁻¹)
t1: Turba/Chimborazo	1.54x10 ¹⁰	23.36 a	3.41x10 ¹⁰	24.23 a	5.60x10 ⁸	19.65 bc	1.00x10 ⁷	16.12 d	9.60x10 ⁵	13.77 e
t2: Mezcla	1.00x10 ⁹	20.64 c	6.40x10 ⁸	19.78 d	6.40x10 ⁸	20.21 ab	3.62x10 ⁸	19.61 b	3.20x10 ⁷	17.19 c
t3: Turba vermiculita	4.40x10 ⁸	19.90 cd	9.68x10 ⁹	22.98 b	1.74x10 ⁹	21.20 a	7.64x10 ⁸	20.24 a	5.52x10 ⁸	20.12 a
t4: Humus / lombriz	2.42x10 ⁹	21.58 b	3.61x10 ¹⁰	24.28 a	2.00x10 ⁷	16.70 d	1.40x10 ⁷	16.34 d	1.00x10 ⁷	16.12 d
t5: Zeolita liofilizada	9.80x10 ⁸	20.64 c	4.20x10 ⁸	19.84 d	2.20x10 ⁷	16.67 d	1.12x10 ⁷	16.15 d	1.06x10 ⁷	16.07 d
t6: Perlas de alginato	3.00x10 ⁸	19.41 d	2.20x10 ⁹	21.39 c	1.12x10 ⁸	18.53 c	9.00x10 ⁷	18.19 c	6.00x10 ⁷	17.89 b

Promedios con la misma letra, son estadísticamente iguales al 5 % (Prueba de Tukey)

Tabla E-8. Análisis de varianza para la concentración de *Azospirillum* spp. en tratamientos líquidos a los 0 días de almacenamiento

Fuente de variación	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Cuadrados medios	Razón de Varianza (Fc)	Probabilidad
Tratamientos	139.73	5	27.95	68.79	< 0,0001
Error	9.75	24	0.41		
Total	149.48	29			

Tabla E-9. Análisis de varianza para la concentración de *Azospirillum* spp. en tratamientos líquidos a los 45 días de almacenamiento

Fuente de variación	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Cuadrados medios	Razón de varianza	Probabilidad
Tratamientos	71.04	5	14.21	37.41	< 0,0001
Error	9.11	24	0.38		
Total	80.16	29			

Tabla E-10. Análisis de varianza para la concentración de *Azospirillum* spp. en tratamientos líquidos a los 90 días de almacenamiento

Fuente de variación	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Cuadrados medios	Razón de varianza	Probabilidad
Tratamientos	21.23	5	4.25	24.53	< 0,0001
Error	4.15	24	0.17		
Total	25.38	29			

Tabla E-11. Análisis de varianza para la concentración de *Azospirillum* spp. en tratamientos líquidos a los 135 días de almacenamiento

Fuente de variación	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Cuadrados medios	Razón de varianza	Probabilidad
Tratamientos	17.36	5	3.47	23.20	< 0,0001
Error	3.59	24	0.15		
Total	20.95	29			

Tabla E-12. Análisis de varianza para la concentración de *Azospirillum* spp. en tratamientos líquidos a los 180 días de almacenamiento

Fuente de variación	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Cuadrados medios	Razón de varianza	Probabilidad
Tratamientos	29.49	5	5.90	73.62	< 0,0001
Error	1.92	24	0.08		
Total	31.41	29			

Tabla E-13. Resumen del Análisis de varianza para la sobrevivencia de *Azospirillum* spp. en tratamientos líquidos a los 0, 45, 90, 135 y 180 días de almacenamiento en el estudio: "Evaluación de soportes sólidos y líquidos para la producción de un biofertilizante a base de *Azospirillum* spp. aplicable al cultivo de maíz (*Zea mays* L.)"

Fuente de variación	Grados de libertad	Cuadrados Medios y Significancia				
		0 días	45 días	90 días	135 días	180 días
Tratamientos	5	27.95 **	14.21**	4.25**	3.47**	5.90**
Error	24	0.41	0.38	0.17	0.15	0.08
Total	29					
Coefficiente de variación (%)		2.93	3.06	2.25	2.10	1.57

** = Altamente Significativo al 1%.

Tabla E-14. Promedios y Tukey al 5% para la sobrevivencia de *Azospirillum* spp. en tratamientos líquidos a los 0, 45, 90, 135 y 180 días de almacenamiento en el estudio: "Evaluación de soportes sólidos y líquidos para la producción de un biofertilizante a base de *Azospirillum* spp. aplicable al cultivo de maíz (*Zea mays* L.)"

Tratamientos	PROMEDIOS Y RANGOS DE SIGNIFICACIÓN DE TUKEY AL 5%									
	Sobrevivencia 0 días de almacenamiento		Sobrevivencia 45 días de almacenamiento		Sobrevivencia 90 días de almacenamiento		Sobrevivencia 135 días de almacenamiento		Sobrevivencia 180 días de almacenamiento	
	Real (UFC.ml ⁻¹)	Ln (UFC.ml ⁻¹)	Real (UFC.ml ⁻¹)	Ln (UFC.ml ⁻¹)	Real (UFC.ml ⁻¹)	Ln (UFC.ml ⁻¹)	Real (UFC.ml ⁻¹)	Ln (UFC.ml ⁻¹)	Real (UFC.ml ⁻¹)	Ln (UFC.ml ⁻¹)
t7: Sol. CMC	3.56x10 ¹⁰	24.18a	2.80x10 ⁸	19.00 b	1.02x10 ⁸	18.40 b	1.00x10 ⁸	18.38 b	6.60x10 ⁷	18.00 c
t8: Sol. Ác. Mál.-Rojo Congo	4.53x10 ¹⁰	24.37 a	3.60x10 ⁸	19.50 b	6.60x10 ⁷	17.87 bc	6.40x10 ⁷	17.95 bc	2.40x10 ⁷	16.97 d
t9: Sol. Caldo nutritivo	3.96x10 ⁹	22.03 b	4.80x10 ⁷	17.60 c	4.60x10 ⁷	17.57 c	4.40x10 ⁷	17.54 c	3.00x10 ⁷	17.06 d
t10: Sol. NFB	2.20x10 ⁸	19.11 c	1.56x10 ⁹	21.08 a	2.60x10 ⁸	19.25 a	2.56x10 ⁸	19.17 a	1.60x10 ⁸	18.87 b
t11: Sol. Melaza	3.00x10 ⁸	18.90 c	2.40x10 ⁹	21.56 a	4.80x10 ⁸	19.98 a	3.84x10 ⁸	19.74 a	3.86x10 ⁸	19.76 a
t12: Sol. Aprox. Biofert. Comercial	3.60x10 ⁹	21.95 b	3.54x10 ⁹	21.91 a	6.80x10 ⁷	18.02 bc	6.80x10 ⁷	18.00 bc	4.60x10 ⁷	17.64 c

Promedios con la misma letra, son estadísticamente iguales al 5 % (Prueba de Tukey)

Tabla E-15. Análisis de Varianza para el pH de t1: Turba de Chimborazo, durante 180 días de almacenamiento

Fuente de variación	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Cuadrados medios	Razón de varianza	Probabilidad
Tratamientos	0,07	4	0,02	4,02	0, 0149
Error	0,09	20	0,00		
Total	0,17	24			

Tabla E-16. Análisis de Varianza para el pH de t2: Turba de Chimborazo + 1%CaCO₃ + 3% Raíz de maíz , durante 180 días de almacenamiento

Fuente de variación	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Cuadrados medios	Razón de varianza	Probabilidad
Tratamientos	0,22	4	0,05	1,70	0,1888
Error	0,64	20	0,03		
Total	0,86	24			

Tabla E-17. Análisis de Varianza para el pH de t3: Turba con vermiculita, durante 180 días de almacenamiento

Fuente de variación	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Cuadrados medios	Razón de varianza	Probabilidad
Tratamientos	0,13	4	0,03	3,32	0,0305
Error	0,20	20	0,01		
Total	0,33	24			

Tabla E-18. Análisis de Varianza para el pH de t4: Humus de lombriz, durante 180 días de almacenamiento

Fuente de variación	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Cuadrados medios	Razón de varianza	Probabilidad
Tratamientos	0,58	4	0,14	4,03	0,0148
Error	0,71	20	0,04		
Total	1,29	24			

Tabla E-19. Análisis de Varianza para el pH de t5: Zeolita liofilizada, durante 180 días de almacenamiento

Fuente de variación	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Cuadrados medios	Razón de varianza	Probabilidad
Tratamientos	0,36	4	0,09	52,53	< 0,0001
Error	0,03	20	0,00		
Total	0,39	24			

Tabla E-20. Análisis de Varianza para el pH de t6: Perlas de Alginato, durante 180 días de almacenamiento

Fuente de variación	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Cuadrados medios	Razón de varianza	Probabilidad
Tratamientos	0,40	4	0,10	1,92	0,1463
Error	1,04	20	0,05		
Total	1,44	24			

Tabla E-21. Análisis de Varianza para el pH de t7: Solución de Carboximetilcelulosa al 5%, durante 180 días de almacenamiento

Fuente de variación	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Cuadrados medios	Razón de varianza	Probabilidad
Tratamientos	0,30	4	0,07	4,39	0,0104
Error	0,34	20	0,02		
Total	0,63	24			

Tabla E-22. Análisis de Varianza para el pH de t8: Solución de Medio ácido málico-rojo congo al 35%, durante 180 días de almacenamiento

Fuente de variación	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Cuadrados medios	Razón de varianza	Probabilidad
Tratamientos	2,80	4	0,70	63,67	< 0,0001
Error	0,22	20	0,01		
Total	3,02	24			

Tabla E-23. Análisis de Varianza para el pH de t9: Solución de caldo nutritivo al 70%, durante 180 días de almacenamiento

Fuente de variación	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Cuadrados medios	Razón de varianza	Probabilidad
Tratamientos	0,46	4	0,11	3,21	0,0344
Error	0,71	20	0,04		
Total	1,17	24			

Tabla E-24. Análisis de Varianza para el pH de t10: Solución de medio NFB al 70%, durante 180 días de almacenamiento

Fuente de variación	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Cuadrados medios	Razón de varianza	Probabilidad
Tratamientos	1,26	4	0,32	4,42	0,0101
Error	1,43	20	0,07		
Total	2,70	24			

Tabla E-25. Análisis de Varianza para el pH de t11: Solución de melaza al 2%, durante 180 días de almacenamiento

Fuente de variación	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Cuadrados medios	Razón de varianza	Probabilidad
Tratamientos	0,13	4	0,03	4,27	0,0117
Error	0,15	20	0,01		
Total	0,27	24			

Tabla E-26. Análisis de Varianza para el pH de t12: Solución aproximada a biofertilizante comercial, durante 180 días de almacenamiento

Fuente de variación	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Cuadrados medios	Razón de varianza	Probabilidad
Tratamientos	0,22	4	0,05	20,77	< 0,0001
Error	0,05	20	0,00		
Total	0,27	24			

Tabla E-27. Resumen del Análisis de Varianza para el pH de cada tratamiento sólido durante 180 días de almacenamiento

Fuente de variación	Grados de libertad	Cuadrados Medios y Significancia					
		pH en t1: Turba de Chimborazo	pH en t2: Mezcla	pH en t3: Turba con vermiculita	pH en t4: Humus de lombri z	pH en t5: Zeolita lío filizada	pH en t6: Perlas de Alginato
Tiempo de almacenamiento	4	0,02 ns	0,05 ns	0,03 ns	0,14 ns	0,09 ns	0,10 ns
Error	20	0,005	0,03	0,01	0,04	0,002	0,05
Total	24						
Coefficiente de variación (%)		1.58	2.92	1.51	2.52	0.54	3.43

ns: no significativo al 1%

Tabla E-28. Resumen del Análisis de Varianza para el pH de cada tratamiento líquido durante 180 días de almacenamiento

Fuente de variación	Grados de libertad	Cuadrados Medios y Significancia					
		pH en t7: Sol. CMC	pH en t8: Sol. AM-RC	pH en t9: Sol. Caldo nutritivo	pH en t10: Sol. NFB	pH en t11: Sol. Melaza	pH en t12: Sol. Apr. Bf. comercial
Tiempo de almacenamiento	4	0,07 ns	0,70 ns	0,11 ns	0,32 ns	0,03 ns	0,05 ns
Error	20	0,02	0,01	0,04	0,07	0,01	0,00
Total	24						
Coefficiente de variación (%)		2.04	1.34	2.50	3.37	2.11	0.73

ns: no significativo al 1%

Tabla E-29. Análisis de Varianza para el porcentaje de materia orgánica de t1: Turba de Chimborazo durante 180 días de almacenamiento

Fuente de variación	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Cuadrados medios	Razón de varianza	Probabilidad
Tratamientos	14,47	4	3,62	2,73	0,0579
Error	26,47	20	1,32		
Total	40,95	24			

Tabla E-30. Análisis de Varianza para el porcentaje de materia orgánica de t2: Turba de Chimborazo + 1% CaCO₃ + 3% raíz de maíz, durante 180 días de almacenamiento

Fuente de variación	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Cuadrados medios	Razón de varianza	Probabilidad
Tratamientos	2,22	4	0,56	3,60	0,0230
Error	3,09	20	0,15		
Total	5,32	24			

Tabla E-31. Análisis de Varianza para el porcentaje de materia orgánica de t3: Turba con vermiculita, durante 180 días de almacenamiento

Fuente de variación	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Cuadrados medios	Razón de varianza	Probabilidad
Tratamientos	0,46	4	0,11	0,76	0,5661
Error	3,04	20	0,15		
Total	3,50	24			

Tabla E-32. Análisis de Varianza para el porcentaje de materia orgánica de t4: Humus de lombriz, durante 180 días de almacenamiento

Fuente de variación	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Cuadrados medios	Razón de varianza	Probabilidad
Tratamientos	3,32	4	0,83	1,93	0,1446
Error	8,60	20	0,43		
Total	11,92	24			

Tabla E-33. Análisis de Varianza para el porcentaje de materia orgánica de t5: Zeolita liofilizada, durante 180 días de almacenamiento

Fuente de variación	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Cuadrados medios	Razón de varianza	Probabilidad
Tratamientos	0,16	4	0,04	2,76	0,0561
Error	0,28	20	0,01		
Total	0,44	24			

Tabla E-34. Análisis de Varianza para el porcentaje de materia orgánica (M.O) de cada tratamiento sólido durante 180 días de almacenamiento

Fuente de variación	Grados de libertad	Cuadrados Medios y Significancia				
		M.O en t1: Turba de Chimborazo	M.O en t2: Mezcla	M.O en t3: Turba con vermiculita	M.O en t4: Humus de lombriz	M.O en t5: Zeolita liofilizada
Tiempo de almacenamiento	4	3.62 ns	0,56 ns	0,11 ns	0,83 ns	0,04 ns
Error	20	1.32	0,15	0,15	0,43	0,01
Total	24					
Coefficiente de variación (%)		2.38	0.82	0.46	1.22	1.27

ns: no significativo al 1%

Anexo F

Fotografías

Anexo F-1. Producción del biofertilizante a base de Cepas de *Azospirillum* spp.



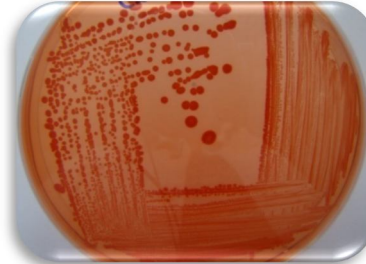
Reactivación de cepa liofilizada



Banco de especies de bacterias diazotróficas del INIAP



Crecimiento de cepa reactivada



Purificación de cepa reactivada



Producción de suspensión bacteriana



Siembra de la cepa en caldo nutritivo



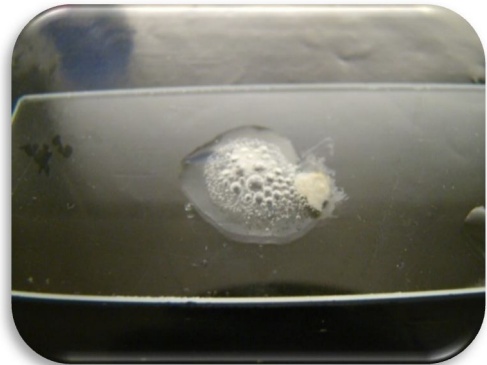
Inoculación de suspensión bacteriana en soportes estériles



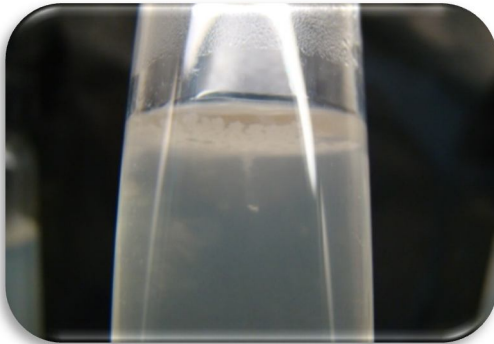
Obtención de biofertilizante



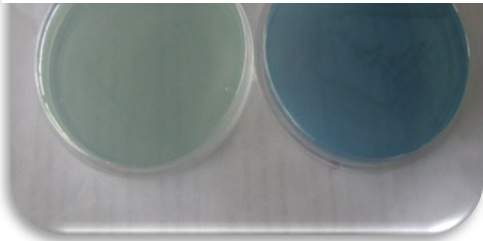
Anexo F-2. Bacilos Gram negativos de la Cepa C-2 de *Azospirillum* spp . 100 X.



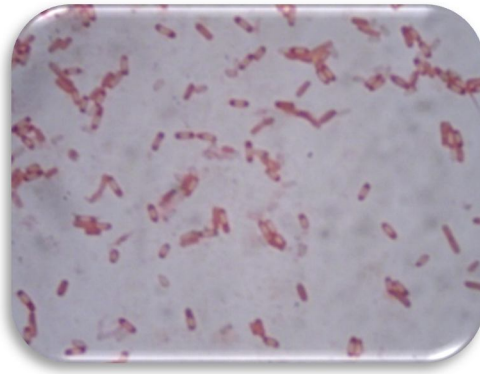
Anexo F-3. Reacción de la enzima catalasa en la Cepa C-2 de *Azospirillum* spp



Anexo F-4. Motilidad de la cepa C-2 de *Azospirillum* spp.



Anexo F-5. Cambio de la coloración del medio de enriquecimiento, por fijación de nitrógeno de la cepa C-2 de *Azospirillum* spp.



Anexo F-6. Gránulos de poli- β -hidroxibutirato en células de la cepa C-2 de *Azospirillum* spp.
100X.