



INSTITUTO NACIONAL AUTÓNOMO DE INVESTIGACIONES AGROPECUARIAS

Estación Experimental Santa Catalina

FECHA DE PRESENTACIÓN: Julio 2009

ESTACIÓN EXPERIMENTAL: Santa Catalina

PROGRAMA: Maíz

AREA DE TRABAJO: Microbiología de Suelos

PROYECTO: Uso y conservación de la biodiversidad de cepas de *Azospirillum* spp. para la producción y validación de un biofertilizante para el cultivo de maíz en la Sierra del Ecuador.

ACTIVIDAD: Evaluación del biofertilizante a base de cepas de *Azospirillum* spp. en el cultivo de Maíz (*Zea mays* L.), en complemento con tres tipos de fertilización.

UBICACIÓN:

Provincias:	Cotopaxi	Tungurahua
Cantones:	Saicedo	Píllaro
Parroquias:	Mulliquindí	San Andrés
Sitios:	La Holia	Potrero Pamba

AUTOR(S): Egdo. César Alexander Cool Zambrano.

CO AUTOR(S): Ing. Msc. Carlos Yáñez
Ing. Francisco Clavijo

COLABORADORES: Departamento Nacional de Protección Vegetal
Departamento de Manejo de Suelos y Aguas.
Departamento de Planificación

FECHA DE INICIO: 07 - 2009

FECHA DE TERMINACIÓN: 06 - 2010

PRESUPUESTO: \$9969,73 (USD)

FUENTES DE FINANCIAMIENTO:

INIAP	61%
Tesista	39%

1. ANTECEDENTES

El maíz (*Zea mays* L.) en la sierra del Ecuador es uno de los cultivos más importantes debido a la gran cantidad de terreno destinado a su cultivo y al papel que cumple como componente básico de la dieta de la población rural (Yáñez, 2007). De acuerdo con el INEC (2007), la superficie de maíz suave cosechada en todo el país, fue de 133.705 ha., con una producción de 96.814 Tm y un rendimiento de 0,72 Tm/ha.

Este cultivo es producido en su mayoría por pequeños productores de escasos recursos, principalmente en terrenos de baja fertilidad, donde prevalecen los sistemas tradicionales de producción, caracterizándose por su baja utilización de fertilizantes y demás insumos agrícolas (INIAP, 2007). Se conoce que 43.324 unidades de producción de maíz tienen menos de 20 ha (SICA, 2003).

Estudios realizados en el Departamento de Manejo de Suelos y Aguas (DMSA), sobre la nutrición del cultivo de maíz en la provincia de Bolívar, han demostrado que el nitrógeno (N) es el principal elemento limitante de la producción, necesitando al rededor de 25 ppm de nitrógeno; siendo común observar síntomas visuales de deficiencia. La falta de este elemento en las plantas causa serios disturbios en su metabolismo, principalmente en el balance proteínas – carbohidratos, lo cual incide directamente en el rendimiento (INIAP 2007).

El nitrógeno es uno de los factores, que gobiernan la productividad de los cultivos ya que procede de tres fuentes principales: las reservas orgánicas e inorgánicas del suelo; los fertilizantes minerales y los abonos orgánicos; y la fijación biológica del nitrógeno que se encuentra en la atmósfera. Sin embargo, las reservas del suelo son muy limitadas y los fertilizantes son costosos y altamente contaminantes, por lo que la fijación biológica de nitrógeno constituye una alternativa importante para aumentar la productividad de los cultivos (Milano, 2007).

Una gran parte de la contaminación del medio ambiente ocasionada por los fertilizantes inorgánicos y los daños que causa sobre los seres vivos puede evitarse si se reduce su aplicación y se sustituye por la utilización de los biofertilizantes microbianos (Milano, 2007).

En Brasil se cultivan millones de hectáreas de soya, las cuales son producidas únicamente con la aplicación de biofertilizantes, esta práctica genera un ahorro de miles de millones de dólares en fertilizantes inorgánicos. Estos beneficios se han observado también en Cuba, en diferentes cultivos, donde los biofertilizantes son utilizados desde 1990 (Milano, 2007).

Algunos géneros de microorganismos empleados para producir biofertilizantes son capaces de fijar al suelo el nitrógeno que se encuentra en la atmósfera y hacerlo disponible para los cultivos son: *Azospirillum*, *Azotobacter*, *Herbaspirillum* y *Burkholderia* (bacterias); *Gigaspora* y *Scutellospora* (micorrizas) (Labandera et al., 2000).

El Programa de Maíz de la Estación Experimental Santa Catalina (EESC) del INIAP, cuenta con una colección de cepas nativas de *Azospirillum* spp. con su respectiva base de datos, de las cuales se han realizado estudios de su aplicación en el cultivo de maíz en campo e invernadero, recomendándose emplear las cepas de *Azospirillum* spp. de las zonas de Chimborazo, Bolívar y Tungurahua, en combinación con fertilizantes

Inorgánicos y orgánicos en diferentes localidades, debido a que se obtuvieron prometedores resultados los cuales muestran un incremento en el desarrollo de las plantas, mayor productividad y mejor rendimiento. Además se realizaron formulaciones de inóculo sólido para el uso en campo, indicando como la mejor a la turba recolectada en la provincia de Chimborazo de la zona de San Juan (Tambohuasha). (Yáñez, *et al.*, 2004).

En posteriores estudios sobre la evaluación de biofertilizantes a base de cepas de *Azospirillum* spp., en la variedad INIAP-102 (blanco blandito mejorado), en la provincia de Chimborazo, se observó buena adaptabilidad y desarrollo en el cultivo de maíz, bajo condiciones de pH del suelo neutro (7.0), temperatura y humedad promedio de 14.9°C y 78%, respectivamente. Determinándose como mejor alternativa económica a la aplicación del uso del biofertilizante más el 50% de la fertilización inorgánica en forma asociada, debido a que se obtuvo una tasa de beneficio costo de \$2.67, lo que significa que por cada dólar se recupera dos dólares con sesenta y siete centavos (Molina, 2006).

II. JUSTIFICACIÓN

El maíz es un cultivo muy importante en el Ecuador, pero su producción se ve limitada principalmente por deficiencias de fertilización nitrogenada, las que son suplidas a través de aplicaciones de fertilizantes inorgánicos, los cuales son costosos y dañinos para el medio ambiente. Una de las mejores alternativas para incrementar la productividad del cultivo de maíz de una manera ecológica es la utilización de biofertilizantes.

El Programa de Maíz del INIAP, ha realizado varios estudios sobre la eficiencia del uso de *Azospirillum* como biofertilizante, comprobando los beneficios de la aplicación de esta bacteria sobre el crecimiento de las plantas y el rendimiento del cultivo. Esto muestra la necesidad de continuar con los estudios del uso de *Azospirillum*, con el fin de obtener una tecnología que beneficie a los productores de maíz y que sea amigable con el medio ambiente.

Por lo tanto se propone la siguiente investigación orientada a validar el comportamiento del cultivo de maíz a la aplicación de diferentes cepas de *Azospirillum*, en dos localidades de la serranía ecuatoriana.

III. OBJETIVOS.

General:

- Evaluar el efecto de la aplicación del biofertilizante a base de tres diferentes cepas de *Azospirillum* spp. en el cultivo de maíz (*Zea mays* L.), en dos localidades, en complemento con tres tipos de fertilización inorgánica.

Específicos:

- Seleccionar la cepa de *Azospirillum* spp. más eficiente en la producción del cultivo de maíz, por localidad.
- Evaluar el mejor tipo de fertilización complementaria que acompañe a *Azospirillum* spp. para una buena producción del cultivo de maíz en cada localidad.
- Realizar el análisis económico de los tratamientos.

IV. HIPÓTESIS

H01: El uso de las cepas de *Azospirillum spp.* como biofertilizante no influye en el desarrollo y productividad del cultivo de maíz.

H02: La aplicación de diferentes tipos de fertilización complementaria, no influye en el rendimiento del cultivo del maíz.

V. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1. Materiales

5.1.1. Experimental:

Semillas INIAP-124, cepas *Azospirillum spp.*, fertilizante inorgánico y orgánico.

5.1.2. Laboratorio:

Cajas Petri, micro pipetas, espátulas, papel absorbente, porta y cubre objetos, tios plásticos, azas, marcadores, varillas de agitación, fundas de polipropileno, tubos eppendorf.

5.1.2.1. Reactivos:

Alcohol antiséptico 96 %, alcohol industrial, Cloruro de Sodio (NaCl), Carbonato de Calcio (CaCO₃), Cloruro de Sodio (CaCl₂ 2H₂O), Cloruro Férrico (FeCl₃), Azul Bromothymol, extracto de levadura, agar-agar, D-L Ácido Málico, Hidróxido de Potasio (KOH), Rojo Congo, extracto de carne, Peptona, agua destilada.

5.1.3. Campo:

Cámara fotográfica, GPS (Global Position System), alímetro, hielera, balde plástico, guantes de contacto, libro de campo, esferográfico, lápiz, flexómetro, estacas, escalímetro, calibrador, lonas.

5.2. Metodología

5.2.1. Características del sitio experimental

El ensayo se realizará en dos localidades: La Holla de la provincia del Cotopaxi y Potrero Pamba en la provincia de Tungurahua.

Cuadro 1. Ubicación política y geográfica de las localidades en estudio¹

Características	Sitios 1	Sitios 2
Provincias	Cotopaxi	Tungurahua
Cantones	Salcedo	Pillaro
Parroquias	Mulliquindil	San Andrés
Sitios	La Holla	Potrero Pamba
Altitud	2724 m	2834 m
Latitud	1°0'24" S	0°06'11" S
Longitud	78°34'19" O	78°33'17" O

5.2.2. Características edafo - climáticas

Cuadro 2. Características edafo - climáticas de los sitios experimentales

Características	Sitio 1	Sitio 2
Temperatura promedio anual ¹	12°C	14.1°C
Precipitación anual ²	580 mm	533 mm
Humedad relativa ²	75 %	75 %
Topografía	Ligeramente inclinado	Ligeramente inclinado
Textura ³	Franco Arenoso	Franco
pH del suelo ³	8.10	6.8

¹ Fuente: Datos tomados con GPS por el autor

² Fuente: (INAMHI, 2005)

³ Fuente: Datos en base al análisis de suelo, realizado en el laboratorio de suelos de la CIESC. Año: 2009

5.2.3. Clasificación taxonómica

Cuadro 3. Taxonomía de los sitios experimentales⁴

Clasificación	Sitio 1	Sitio 2
Orden	Inceptisoles	Mollisoles
Suborden	Andepts	Ustolls
Gran grupo	Eutrandepts	Durustolls

5.2.4. Factores en estudio

- a. Biofertilizantes a base de tres cepas de *Azospirillum* spp.

Cuadro 4. Identificación de biofertilizantes a base de *Azospirillum* spp. (4)

Código	Identificación	Procedencia
B1	Cepa1-Tungurahua	Tungurahua, Pillaro, Emilio Terán, El Capulicito
B2	Cepa2-Bolívar	Bolívar, Guaranda, Veintimilla, Laguacoto 2
B3	Cepa3-Chimborazo	Chimborazo. Alausí, Sibambe, Cochapamba
B4	Sin ninguna cepa.	Testigo

- b. Fertilizaciones (4).

Cuadro 5. Fertilizaciones.

Código	Descripción
fc	Fertilización inorgánica completa (100%)
fm	Fertilización inorgánica media (50%)
fo	Fertilización orgánica
ft	Testigo (sin fertilización)

5.2.5. Tratamientos

Los 16 tratamientos que resultan de la combinación de biofertilizantes, por los tipos de fertilización, se presentan en el Cuadro 6, para cada localidad en estudio.

Cuadro 6. Tratamientos por localidad.

Tratamientos	Código	Descripción
1	b1 + fc	Biofertilizante C1 Tungurahua + Fertilización inorgánica 100%
2	b1 + fm	Biofertilizante C1 Tungurahua + Fertilización inorgánica 50%
3	b1 + fo	Biofertilizante C1 Tungurahua + Fertilización orgánica.
4	b1 + ft	Biofertilizante C1 Tungurahua + Testigo
5	b2 + fc	Biofertilizante C2 Bolívar + Fertilización inorgánica 100%
6	b2 + fm	Biofertilizante C2 Bolívar + Fertilización inorgánica 50%
7	b2 + fo	Biofertilizante C2 Bolívar + Fertilización orgánica.
8	b2 + ft	Biofertilizante C2 Bolívar + Testigo
9	b3 + fc	Biofertilizante C3 Chimborazo + Fertilización inorgánica 100%
10	b3 + fm	Biofertilizante C3 Chimborazo + Fertilización inorgánica 50%
11	b3 + fo	Biofertilizante C3 Chimborazo + Fertilización orgánica.
12	b3 + ft	Biofertilizante C3 Chimborazo + Testigo
13	b4 + fc	Testigo + Fertilización inorgánica 100%
14	b4 + fm	Testigo + Fertilización inorgánica 50%
15	b4 + fo	Testigo + Fertilización orgánica.
16	b4 + ft	Testigo sin <i>Azospirillum</i> + Sin fertilización

5.2.6. Características del experimento

Área total del ensayo:	1306.4 m ²
Área total neta del ensayo:	345.6 m ²
Número de parcelas:	48
Área total de la parcela:	20 m ² (5 m x 4 m)
Área de la parcela neta:	7.2 m ² (3 m x 2.4 m)
Número de plantas por parcela:	100
Número de plantas por parcela neta:	36
Número de plantas por golpe:	2
Número de surcos:	5 por parcela total y 3 por parcela neta
Distancia entre surcos:	0.80 m
Distancia entre plantas:	0.50 m
Control del efecto borde:	Se eliminarán un surco y dos sitios de cada extremo de las parcelas para evitar el efecto borde (Anexo 1).

5.2.7. Diseño experimental

Se utilizará un Diseño de Parcela Dividida (DPD) con 3 repeticiones.

5.2.8. Análisis estadístico

Para cada localidad se realizará el análisis de varianza (ADEVA), Cuadro 7.

Cuadro 7. Esquema de ADEVA

FUENTES DE VARIACION	GRADOS DE LIBERTAD
Total	47
Repeticiones	2
Factor (a) Biofertilizante	3
Error (a)	6
Factor (b) Fertilizaciones	3
Fac. (a) x Fac. (b)	9
Error (b)	24
CV. (a)	
CV. (b)	

5.2.9. Análisis funcional

Se calculará el coeficiente de variación y se realizará la prueba de Tukey al 5% para los tratamientos que presenten significación estadística.

5.2.10. Análisis Económico

Para el análisis de Presupuesto Parcial de los tratamientos se utilizará el método propuesto por el CIMMYT (1988).

5.3. Variables y métodos de evaluación

5.3.1. Población de *Azospirillum* spp.

Mediante análisis microbiológico del suelo (al inicio y al final del ensayo), se evaluará la población de *Azospirillum* spp. de cada unidad experimental en medio NFB (nitrogen fixation biological) semi-sólido (Anexo 2) (Espinoza, 2004). Los resultados se expresarán en Unidades Formadoras de Colonia por gramo de suelo seco (UFC/gss), según el método estimativo del número más probable utilizando la tabla de Mc. Crady (Anexo 3).

5.3.2. Porcentaje de emergencia.

Se determinará dividiendo el número de plantas emergidas para el número de semillas sembradas y se multiplicará por cien; antes del raleo, de cada parcela neta (Espinoza, 2004).

5.3.3. Altura de la planta en estado V8.

Al instante en que el 50% de las plantas alcancen el estado fenológico V8, se evaluarán 5 plantas tomadas al azar de cada parcela neta. Con la ayuda de un flexómetro se medirá desde la base hasta el ápice y los valores se registrarán en centímetros (Ritchie *et al.*, 2003).

5.3.4. Altura de la mazorca

Al instante en que el 50% de las plantas alcancen el estado fenológico VR3, se evaluarán las plantas tomadas en la variable anterior y con la ayuda de un flexómetro se medirá desde la base hasta el nudo de inserción de la mazorca. Los valores se registrarán en centímetros (Ritchie *et al.*, 2003).

5.3.5. Daño a la mazorca por *Heliothis zea* y *Euxesta eluta*

Se registrará a la cosecha en choclo y se calificará el daño causado por *Heliothis zea* y *Euxesta eluta*, utilizando la escala de 1 a 5 propuesta por el (CIMMYT 1986), presente en el cuadro 8.

Cuadro 8. Escala de daño a la mazorca por insectos.

Significado	Valor	% de granos infestados	Valor medio
Sin daño	1	0	0
Infestación débil	2	1 - 10	5,5
Infestación ligera	3	11 - 25	18
Infestación moderada	4	26 - 60	43
Infestación severa	5	61 - 100	80,5

Con las calificaciones de las mazorcas se realizará un promedio ponderado.

$$\text{Promedio ponderado (\%)} = (x_1y_1 + x_2y_2 + \dots + x_{10}y_{10})/T$$

Donde:

X = Número de mazorcas en cada valor de la escala.

Y = Valor medio correspondiente a la escala.

T = Número total de mazorcas.

5.3.6. Daño a la mazorca por *Fusarium moniliforme*

En la cosecha, se calificarán las mazorcas que presenten infección natural por *Fusarium moniliforme* en todas las parcelas netas. Se calificará, según la escala de 1 a 6 presente en el cuadro 9 (CIMMYT 1986).

Cuadro 9. Escala de daño a la mazorca por enfermedades.

Valor	% de granos afectados	Significación	Valor medio
1	0	Daño ausente	0
2	1-10	Daño ligero	5,5
3	11-25	Daño moderado	18
4	26-50	Daño severo	38
5	51-75	Daño muy severo	63
6	76-100	Daño muy extremo	88

Con las calificaciones de las mazorcas se realizará un promedio ponderado.

$$\text{Promedio ponderado (\%)} = (x_1y_1 + x_2y_2 + \dots + x_{10}y_{10})/T$$

Donde:

X = Número de mazorcas en cada valor de la escala.

Y = Valor medio correspondiente a la escala.

T = Número total de mazorcas.

5.3.7. Longitud de la mazorca

Se medirá desde la base, en su inserción con el pedúnculo, hasta su ápice, y el valor que se registrará será el promedio de 10 mazorcas tomadas al azar y se expresará en cm (IBPGR, 1991).

5.3.8. Diámetro de la mazorca

Se tomarán 10 mazorcas al azar de las plantas de cada parcela neta y se medirá el diámetro, en el sector medio de cada mazorca y se registrará el valor promedio en cm (IBPGR, 1991).

5.3.9. Clasificación de las mazorcas por clase (sacos/ha)

Se contabilizará el número de mazorcas por clase, en base a la norma INEN 1761 que establece tres categorías: pequeños (III), medianos (II) y grandes (I) (Anexo 4). Luego se expresará en sacos por hectáreas, para lo cual se tomará como referencia que un saco contiene 120 choclos de la clase 1, 150 choclos de la clase 2 y 180 choclos de la clase 3.

5.3.10. Estimación del rendimiento (kg/ha)

La estimación del rendimiento final se efectuará a los 6 meses después de la siembra utilizando la siguiente fórmula:

$$\text{Rendimiento} = (\text{Plantas/ha}) * (\text{Mazorcas/planta}) * (\text{Granos/mazorca}) * (1 / \text{número de granos por kilo})$$

Se contará el número de mazorcas de cada planta de la parcela neta y se dividirá para el número de plantas. Luego se tomará 3 mazorcas al azar de las plantas de la parcela neta y se contará el número de granos por mazorca. El número de granos por kilo se tomará de semillas con el 13% de humedad de la variedad INIAP-124 (CIMMYT, 1994).

5.3.11. Análisis de nitrógeno en el suelo

A la cosecha en cada parcela neta, se realizará el análisis de nitrógeno amoniacal en el suelo mediante la metodología del análisis químico de suelos establecida en el laboratorio de Suelos y Aguas del INIAP (Alvarado *et al.*, 2000).

5.3.12. Materia Seca

Se expresará en porcentaje. Se tomarán 5 plantas al azar de cada parcela neta al inicio de la senescencia, se pesarán las muestras en fresco para luego introducirlas en la estufa a 65°C hasta obtener un peso constante y obtener la muestra seca. Se utilizará la siguiente ecuación (INIAP/PNRT-papa, 2008).

$$\% \text{ Materia seca} = (\text{Peso seco/Peso fresco}) \times 100$$

Con estos datos se calculará la producción de materia seca de la planta en Kg/ha.

5.3.13. Determinación de nitrógeno en tejido vegetal

En el material que se utilizó para materia seca, se determinará el contenido de nitrógeno: mediante la metodología de micro kjeldahl, establecida en el laboratorio de análisis de plantas del INIAP (Alvarado, *et al.* 2000). Con los resultados obtenidos de concentración de nutrientes y rendimiento de materia seca de la planta; se calculará la extracción de nitrógeno los cuales se expresarán en Kg/ha.

5.3.14. Presupuesto parcial y tasa de retorno marginal de los tratamientos.

Para el análisis de presupuesto parcial y tasa de retorno marginal se utilizará el método propuesto por el CIMMYT (1988). Que considerará para el análisis: los resultados de los rendimientos obtenidos ajustados con un factor de ajuste del -20%, el precio actual de campo de maíz, los costos que varíen entre los tratamientos y el precio de campo del inoculante.

5.4. Manejo específico del experimento

5.4.1. Fase de laboratorio

En el área de Microbiología de Suelos del Departamento Nacional de Protección Vegetal (DNPV), se realizará: la reactivación, purificación, fermentación, producción de inoculantes líquidos y sólidos de *Azospirillum* spp., siguiendo la metodología y procedimientos descritos en el ANEXO 5.

5.4.2. Fase de campo

5.4.2.1. Análisis del suelo

Para cada localidad en estudio se realizará el análisis físico - químico del suelo, para la determinación de macro y micronutrientes, materia orgánica, conductividad eléctrica, pH, capacidad de intercambio catiónico y textura; dos meses antes de la siembra, con el fin de realizar la recomendaciones de fertilización.

5.4.2.2. Análisis químico del abono orgánico

Se realizará el análisis químico de macro y micro nutrientes, MO, CE y pH, del abono orgánico a utilizarse en la presente investigación.

Todos los análisis serán realizados por el Departamento de Suelos y Aguas del INIAP

5.4.2.3. Preparación del terreno

La preparación del terreno se realizará una labor de arada, rastrada y finalmente el surcado.

5.4.2.4. Siembra

Se realizará la siembra manualmente colocando 3 semillas inoculadas de maíz por sitio de la variedad INIAP 124, a una distancia de 50 cm entre planta y 80 cm entre surco, sin desinfectar la semilla debido a que *Azospirillum* spp. es un microorganismo vivo que no sobrevive a la aplicación de insecticidas, acaricidas y fungicidas y su actividad se reduce en presencia de estos (Bernal y Graham, 2001).

5.4.2.5. Labores culturales

Se realizará: el raleo a 2 plantas por sitio, rascadillo y aporque a los 45 días después de la siembra.

5.4.2.6. Riego

Debido a que el ensayo será establecido fuera de época, se realizará el riego por inundación de acuerdo a las necesidades del cultivo y a las condiciones climáticas de los sitios experimentales, en forma de canchales o surco por surco de cada parcela experimental, sin permitir que el agua pase de una a otra parcela experimental.

5.4.2.7. Fertilización

La fertilización inorgánica se realizará en base al análisis químico del suelo, colocando todo el 18-46-0 a la siembra en la base del surco. La urea se aplicará en forma fraccionada a la siembra en la base del surco, a los 30 días en la deshierba y 60 días en el momento del aporque. Las dosis serán establecidas por el Departamento de Suelos y Aguas del INIAP.

El abono orgánico Ecoabonaza (Anexo 6) se aplicará a la siembra, cuya dosis será establecida por el Departamento de Suelos y Aguas del INIAP, previo al análisis químico del abono.

Todas las épocas de aplicación de los fertilizantes tanto inorgánicos como orgánicos, serán establecidas en base a las recomendaciones del Departamento de Suelos y Aguas del INIAP.

5.4.2.8. Control de malezas

Se controlará de forma manual (deshierba manual), debido a que *Azospirillum* es un organismo vivo que no sobrevive a la aplicación de herbicidas, por lo que no se utilizará el control químico.

5.4.2.9. Control de plagas

Para el control de insectos no se utilizará el control inorgánico, por lo antes mencionado y en caso de ser necesario se utilizarán tres aplicaciones de aceite vegetal comestible para las plagas de la mazorca (*Heliothis zea* y *Euxesta eluta*), de acuerdo a la metodología descrita por (Dobronski, *et al.* 1998).

5.4.2.10. Cosecha

La cosecha se realizará en forma manual, en choclo cuando el grano esté en estado "lechoso" y se clasificará por mazorca en tres clases o categorías: (I) grande, (II) mediano y (III) pequeños (INEN, 1761).

VI. CRONOGRAMA

ACTIVIDADES	MESES											
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Elaboración de propuesta	■											
Aprobación propuesta	■	■										
Reactivación y purificación de cepas	■	■	■									
Fermentación y producción del inóculo líquido		■	■									
Preparación del inóculo sólido		■	■									
Inoculación de la turba		■	■	■								
Inoculación de la semilla			■	■	■							
Labores preculturales			■	■	■	■						
Siembra			■	■	■	■						
Toma de datos			■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
Fertilización			■	■	■	■						
Raleo				■	■	■	■					
Aporque				■	■	■	■					
Control de malezas				■	■	■	■	■	■	■	■	■
Control de plagas					■	■	■	■	■	■	■	■
Cosecha								■	■	■	■	■
Redacción del documento										■	■	■
Presentación informe final											■	■

VII. PRESUPUESTO

Rubro	Unidad	Cantidad	Unitario USD	Total USD
LABORATORIO				
Cajas Petri	Unidades	1000	0,20	200,00
Fundas de polipropileno	Paquetes	30	0,50	15,00
Guantes Quirúrgicos	Paquete	5	26,00	130,00
Algodón	Paquete	5	4,50	22,50
Papel toalla	Rolló	12	2,00	24,00
Alcohol al 97%	Galón	10	8,50	85,00
Alcohol industrial	Galón	10	3	30,00
Iodoclorito de sodio al 10%	Galón	5	8,20	41,00
Subtotal				547,50
Reactivos				
D-L, Acido Máfico	Frasco 500g	1	240,00	240,00
Fosfato de potasio monobásico (K ₂ HPO ₄)	Frasco 500g	1	110,50	110,50
Extracto de Levadura	Frasco 500g	1	160,00	160,00
Cloruro de Sodio (NaCl)	Frasco 500g	1	180,00	180,00
Hidróxido de potasio (KOH)	Frasco 500g	1	180,00	180,00
Agar Bacteriano	Frasco 500g	1	320,00	320,00
Extracto de Carne	Frasco 500g	1	160,00	160,00
Peptona	Frasco 500g	1	150,00	150,00
Subtotal				1580,50
Servicios				
Análisis de suelos: completo	Análisis	4	11,42	45,70
Análisis de abono orgánico - pH + MO + CE	Análisis	1	40,5	40,50
Análisis de materia seca	Análisis	95	1,50	144,00
Análisis foliar	Análisis	96	10,00	960,00
Subtotal				1190,20
CARIPO				
Equipos y herramientas				
Arada rastrada	Hora	4	15	60,00
Surcada	Hora	2	15	30,00
Estacas	Unidad	60	0,05	3,00
Subtotal				93
Insumos				
Semillas	Kg	7,8	2,50	19,50
Urea	Kg	10,08	1,00	10,08
18 - 46 - 0	Kg	6,26	1,6	10,01
Ecoabonoaza	Kg	120	0,11	13,20
Subtotal				52,79
Mano de Obra				
Siembra y fertilización	Jornal	20	10,00	200,00
Deshierbe y Aparque	Jornal	6	10,00	60,00
Controles fitosanitarios	Jornal	6	10,00	60,00
Cosecha	Jornal	15	10,00	150,00
Clasificación	Jornal	6	10,00	60,00
Subtotal				470,00
MATERIALES DE OFICINA				
Marcador permanente punta fina	Unidad	3	2,00	6,00
Resmas de papel	Paquete	5	5,00	25,00
Impresiones	Unidades	1000	0,10	100,00
Empastados	Unidades	4	50	200,00
Subtotal				331,00
MOVILIZACION				
Combustible	Galón	50	1,00	50,00
Viales	Unidad	4	50,00	200,00
Subsistencias	Unidad	20	25,00	500,00
Testeta	Mes	12	380,00	4560,00
Subtotal				5310,00
SUBTOTAL DE COSTOS				9494,99
Imprevistos		5%		474,74
TOTAL				9969,73

VIII. BIBLIOGRAFIA

- ALVARADO, S; CORDOVA, J; LOPEZ, M. 2000. Metodología de análisis físico químico de suelos, aguas y foliares. Tercera aproximación. Laboratorio del Departamento de Manejo de Suelos y Aguas. Estación Experimental Santa Catalina. INIAP. pp.6 - 24. Quito- Ecuador.
- BASHAN, Y. 1997. Aplicaciones Biotecnológicas en Ecología Microbiana. Cundinamarca, CO. Pontificia Universidad Javeriana – Centro de Investigaciones Biológicas del Noreste. pp. 1 a 3.
- BASHAN, Y. 1998. Inoculants of plant growth-promoting bacteria for use in agricultura. Elsevier Science Inc. Biotechnology advances. Vol. 16, No. 4. pp. 729 a 770.
- BERNAL, G., GRAHAM, P H. 2001. Diversity in the rhizobia associated with *Phaseolus vulgaris* L. in Ecuador, and comparisons with Mexican bean rhizobia. Canadian Journal of Microbiology. 47(6):530-531
- BERNAL, G., SUAREZ, A., JEREZ., M., CAMPAÑA. 2002. Inoculación de la semilla de leguminosas con la bacteria *Rhizobium*. Plegable Divulgativo No. 195. Estación Experimental Santa Catalina. INIAP. Quito – Ecuador.
- CIAT. 1988. Manual de métodos de evaluación, selección y manejo. Simbiosis leguminosa – *Rhizobium*. Proyecto Especial CIAT- UNDP. Capítulo 11.
- CIMMYT. 1986. Manejo de ensayos e informe de datos para el programa de ensayos internacionales de maíz del CIMMYT. México. pp. 13 a 19
- CIMMYT. 1988. La formulación de recomendaciones a partir de datos agronómicos: Un manual metodológico de evaluación económica. México, D.F., MX. 79 p.
- CIMMYT. 1994. Identificación de problemas en la producción de maíz tropical. Guía de campo. México, D.F., MX. 113 p.
- DOBRONSKI, J; SILVA, E; VÁSQUEZ, J. 1998. Control del gusano de la mazorca de maíz mediante el uso de aceite vegetal. Plegable Divulgativo No. 166. INIAP-COSUDE. Quito. Ecuador-
- ESPINOZA, L. 2004. Caracterización y selección de la bacteria diazotrófica *Azospirillum* spp., asociado con el maíz de altura (*Zea mays* L). INIAP. Tesis Ingeniero. Agronomo. 90 p.
- FALLICK, E.; OKON, Y.; FISCHER, M. 1988. Growth response of maize roots to *Azospirillum* inoculation. Effect of soil organic matter content, number of rhizosphere bacteria and tuning of inoculation. Soil Biol. Biochem. 20: 25 a 49.
- GIRARD, H., ROUGIEX, R. 1964. Técnica de Microbiología Agrícola. Zaragoza – España. Pág. 244, Pág.27.

- IBPGR, 1991. Descriptors for Maize. Internacional Maize and Weat. Improvement Center. Mexico City /Internacional Board for Plant Genetic Resources. Rome. Pp: 9 - 25
- INEC, 2007. Visualizador de estadísticas agropecuarias del Ecuador ESPAC. (En línea). Quito, Ecuador. Consultado 16 de Abril de 2009. Disponible en www.ecuadorencifras.com/lcds-samples/testdrive-remoteobject/main.html
- INEN, 1761. Norma Técnica Ecuatoriana NTE 1761:1991 para la industria alimentaria. productos agrícolas, hortalizas, choclo. www.inen.gov.ec/normas/index2.php
- INIAP. 2007. Manejo de Nutrientes por Sitio Específico con Labranza de Conservación en el Cultivo de Maíz. Departamento de Suelos y Agua. Estación Experimental Santa Catalina. Quito-Ecuador.
- INIAP/PNRT-PAPA, 2008. Guía para el manejo y toma de datos de ensayos de mejoramiento de papa. Instituto nacional autónomo de investigaciones agropecuarias. Programa nacional de raíces y tubérculos - papa. Documento por publicar. Quito- Ecuador.
- INAMHI, 2005. Anuario Meteorológico. Quito- Ecuador.
- LABANDERA, C.; VITOTA, G.; CANZANI, F.; SORIA, S.; 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 a 22.
- MEJÍA, L. 1986. Mapa General de Suelos del Ecuador. IGM. PRONAREC.
- 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.
- 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 inorgánicas y dos fertilizaciones orgánicas. Tesis Ingeniero. Agrónomo. Universidad Técnica de Cotopaxi. Ciencias Agrícolas. Ambientales y Veterinarias, Ingeniería Agronómica. pp. 36 a 38.
- NOVO, R. 2002. Memorias curso internacional de microbiología del suelo, los biofertilizantes y la biofertilización. Quito, EC. ASOINCO. 1 disquete Hd. 3 ½ pulgadas.
- RITCHIE, S., HANWAY, J., BENSON, G. 2003. Como se Desarrolla una Planta de Maíz. Universidad de Ciencia y Tecnología del Estado de Iowa. Edit. INPOFOS. Reporte especial No. 48. Canada, Estados Unidos. pp. 3 a 21
- RODRÍGUEZ, E., CÁCERES, A. 1982. Improved médium for isolation of *Azospirillum* spp., *Applia Microbiology and Environmental*. 44(2): 940 a 991.

SICA, 2003. Servicio de Información Agropecuaria del Ministerio de Agricultura y Ganadería del Ecuador. www.sica.gov.ec/agronegocios/biblioteca/Ing%20Rizzo/maiz/cultivo_maiz.htm

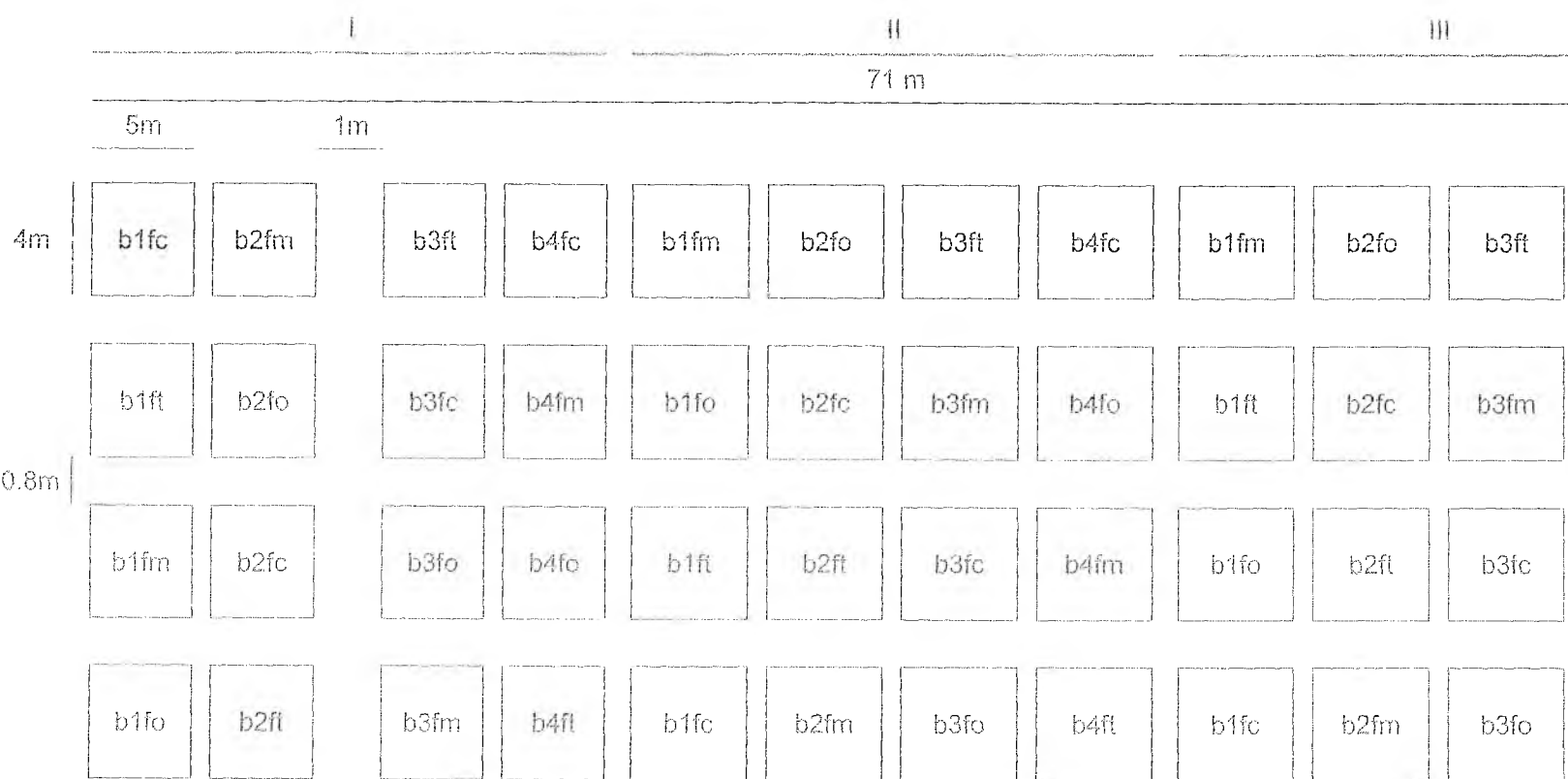
UNIVERSIDAD COMPLUTENSE, ES. 2001. Guía de prácticas de microbiología y parasitología ambiental (en línea). Madrid. ES. Facultad de Farmacia, Departamento de Microbiología II. Consultado 10 feb. 2009. Disponible en <http://www.ucm.es/info/mfar/PDF/Ambiental.pdf>

YÁNEZ, C.; ZAMBRANO, J.; CAICEDO, M.; SÁNCHEZ, H.; HEREDIA, J. 2004. Informe final del Proyecto IQ-CV-102. Identificación y desarrollo de un biofertilizante para el cultivo de maíz en la sierra del Ecuador. INIAP. Ecuador. pp. 41 a 49.

YÁNEZ, C. 2007. Manual de Producción de Maíz para Pequeños Agricultores y Agricultoras. Programa de Maíz. INIAP. Ecuador.

ANEXOS

I. Croquis del ensayo en campo



Anexo 2. Medio NFB (nitrogen fixation biological) semi-sólido (Rodríguez y Cáceres 1982).

Reactivos	Cantidad
Ácido Máfico	5 g
K ₂ HPO ₄	0.5 g
MgSO ₄ 7H ₂ O	0.2 g
CaCl ₂ 2H ₂ O	0.02 g
Na ₂ MoO ₄ 2H ₂ O	0.002 g
MnSO ₄	0.01 g
FeCl ₃ 6H ₂ O	0.01 g
Biotina	0.01 g
Azul de Bromotimol	3 ml
Agar	1.75 g
Agua Destilada	997 ml
pH	7.0

Anexo 3. Tabla de Mc Crady: 3 tubos por dilución (Universidad Complutense, 2001).

Número Característico	Número de microbios	Número característico	Número de microbios	Número característico	Número de microbios
000	0.0	201	1.4	302	6.5
001	0.3	202	2.0	310	4.5
010	0.3	210	1.5	311	7.5
011	0.6	211	2.0	312	11.5
020	0.6	212	3.0	313	16.5
100	0.4	220	2.0	320	9.5
101	0.7	221	3.0	321	15.0
102	1.1	222	3.5	322	20.0
110	0.7	223	4.0	323	30.0
111	1.1	230	3.0	330	25.0
120	1.1	231	3.5	331	45.0
121	1.5	232	4.0	332	110.0
130	1.6	300	2.5	333	140.0
200	0.9	301	4.0		

Anexo 4. Clasificación del choclo Por su tamaño. Norma Ecuatoriana Obligatoria INEN-1761. 1900-09.

CLASE	Diámetro ecuatorial (cm)		Longitud (cm)	
	Mínimo	Máximo	Mínimo	Máximo
Primera clase		> $\phi = 7$		> $\phi = 20.1$
Segunda clase	4.0	6.9	10.0	20.0
Tercera clase		< $\phi = 3.9$		< $\phi = 10.0$

Anexo 5. Metodología y procedimiento para la reactivación, purificación, fermentación, producción de inoculantes líquidos y sólidos de *Azospirillum* spp.

1. Reactivación y purificación de cepas *Azospirillum* spp.

Previamente se deben preparar los medios de cultivo:

- a. Ácido Máfico – Rojo Congo sólido para el aislamiento y purificación (Rodríguez y Cáceres 1982).

Reactivos	Cantidad
Ácido Máfico	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

- b. Peptona al 1 % para la reactivación (CIAT, 1988).

Reactivos	Cantidad
Peptona	0.1 g
Agua destilada	100 ml

- c. Caldo Nutritivo para la fermentación (Girard y Rougicux 1964).

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

Una vez elaborados los medios se deben autoclavar con materiales de vidrio, asas, agua destilada, etc a 15 PSI (o libras presión = 121 °C), durante 30 min.

Para la reactivación se colocará 1000 micro litros (µL) de peptona al 1 %, en los tubos eppendorf que contienen las cepas liofilizadas, agitándose hasta homogenizar la mezcla con la ayuda del vortex, a continuación se tomará 50 µL de la cepa y se colocará en cajas

Petri con medio Ácido Málico – Rojo Congo sólido, con la ayuda de un triángulo de vidrio estéril se dispersa bien hasta que se seque y se lo coloca en incubadora a una temperatura de 30°C por 7 días.

Luego se tomarán secciones puras, de la bacteria con la ayuda de un haza de platino para colocarlas en cajas Petri con medio Ácido Málico – Rojo Congo sólido, e incubarlas por 7 días a 30°C.

Finalmente se realizarán pruebas de Tinción de Gram, para la constatación de las cepas (Girard y Rougieux, 1964).

2. Fermentación y producción del inóculo líquido

De las cajas con medio de cultivo Ácido Málico - Rojo Congo, se seleccionará varias colonias y se transferirán secciones de la bacteria puras con una haza de platino a un matraz de 100 ml, que contendrá 40 ml de caldo nutritivo (Espinoza, 2004). Luego se fermentará 150 ml de inóculo puro para cada cepa de *Azospirillum* spp.

Las cepas se propagarán en agitación rotatoria a (120 rpm) a 19°C durante 20 a 24 horas, hasta obtener la densidad celular de 1 (Fallick *et al.*, 1988). En un espectrofotómetro se medirá la densidad celular, para lo cual con una pipeta estéril se tomará 10 ml de cada propagación bacteriana y se verterá en una celda del espectrofotómetro. La muestra se someterá a 540 nm, y se obtendrá un valor de 1, el cual, indicará que la muestra contenía aproximadamente 10^9 UFC/ml (unidades Formadoras de Colonias por mililitro) según lo descrito por Bashan (1997). Estas actividades se realizarán en el Laboratorio del Departamento de Manejo de Suelos y Aguas (DMSA) de la Estación Experimental Santa Catalina (INIAP).

3. Preparación del inculante sólido

Para la preparación del inculante sólido se recolectará 100 kg de turba del sector de Tambohuasha, Cantón San Juan, Provincia de Chimborazo, la cual fue recomendada en el estudio preliminar por Yáñez *et al.*, 2004.

La turba se secará a 100°C por dos días, luego se molerá y se tamizará en un tamiz de 180 μ m. El empacado de la turba se realizará en fundas de polipropileno de baja densidad y en cada una de ellas se verterá 50g del material procesado (turba del Chimborazo del sector Tambohuasha). Las fundas selladas serán sometidas al autoclave con vapor húmedo (121°C, 15 PSI) durante tres horas, fraccionadas en tres días (Yáñez *et al.*, 2004).

4. Inoculación de la turba

La impregnación del inculante líquido en la turba se realizará mediante la inyección de 20 ml de suspensión bacteriana que contendrá 1×10^9 UFC/ml. Los sustratos inoculados se incubarán a 37°C por 8 días, período en el cual se realizarán movimientos con el fin de homogenizar el material, luego se almacenará en refrigeración a 4°C durante una semana (Yáñez *et al.*, 2004).

Para evaluar la sobre vivencia de las bacterias se utilizará la técnica llamada "método de siembra superficial en placa" que consiste en tomar una alícuota de 1g de cada soporte sólido, la cual será suspendida en 9 ml de agua destilada estéril. Se prepararán 7 diluciones con cada funda del inoculante sólido (turba) desde 10^2 hasta 10^8 . De cada dilución se sembrará 1 ml en una caja Petri con medio Ácido Máfico Rojo Congo y se determinará la presencia de la bacteria *Azospirillum* spp. a los 7 días. Posteriormente se realizará un conteo poblacional de las células bacterianas del inoculante sólido (Rodríguez y Cáceres, 1982).

5. Inoculación de la semilla

En un recipiente plástico se mezclarán 100 g de azúcar en medio litro de agua. luego se verterá 5 kg de semilla de maíz en la solución y se mezclará bien hasta que la semilla presente un color cristalino. Posteriormente se añadirá 50 g del soporte sólido en cada recipiente, se mezclará hasta que quede bien adherida a la semilla mostrando un color oscuro homogéneo. La semilla inoculada se debe sembrar inmediatamente después de la inoculación (Bernal *et al.*, 2002).

Anexo 6. Composición inorgánica Ecoabonaza.

Componentes	Cantidad
Materia Orgánica	70%
pH	7.01
Nitrógeno	2.8% a 3.0%
Fósforo	1.65%
Potasio	1.9%
Calcio	3.3% a 5%
Magnesio	0.7%
Azufre	0.51%
Boro	40 a 56 ppm
Zinc	236 ppm
Cobre	52 ppm
Hierro	1003 ppm
Manganeso	644 ppm
Humedad	21.4%