



INSTITUTO NACIONAL AUTÓNOMO DE INVESTIGACIONES AGROPECUARIAS

FECHA DE PRESENTACIÓN: Septiembre 2009

ESTACIÓN EXPERIMENTAL: Santa Catalina.

PROGRAMA/DEPARTAMENTO: Maíz / Protección Vegetal

AREA DE TRABAJO: Microbiología

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

UBICACIÓN:

Provincia: Pichincha

Cantón: Mejía.

Parroquia: Cutuglagua.

Lugar: Departamento Nacional de Protección Vegetal de la Estación Experimental Santa Catalina

AUTOR: Egda. Yolanda Elizabeth Pallo Barona

CO-AUTORES: Ing. Msc. Carlos Yáñez
Ing. Francisco Clavijo

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

FECHA DE INICIO: 09 - 2009

FECHA DE FINALIZACIÓN: 08 - 2010

PRESUPUESTO: 6622 USD.

FUENTES DE FINANCIAMIENTO:

INIAP	31 %
Tesista	69 %

I. ANTECEDENTES

En el 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.*, 2008). Un factor limitante para su producción, es la escases de nitrógeno en el suelo, para solucionar este inconveniente normalmente se aplica urea (Yáñez, 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).

Durante los últimos años, la biotecnología ha mejorado las condiciones para desarrollar este cultivo. La aplicación de bacterias promotoras del desarrollo vegetal (PGPRs), como *Pseudomonas*, *Azospirillum*, etc. han producido un incremento del rendimiento (Ferlini y Díaz: 2006).

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, 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, 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, 1998).

Por lo que es necesario desarrollar un biofertilizante a base de cepas nativas de *Azospirillum* spp. que viven 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 toma de agua y minerales (Burdman *et. al.* 2001). lo cual, sumado a la fijación biológica de nitrógeno atmosférico, promueven el crecimiento y rendimiento de los cultivos (Galal *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, 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 *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 2121,691kg/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 4000kg/ha (con 100% fertilización química) a 4167,4kg/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), 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, 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, 1998).

Según la Resolución N° 310/1994 del SENASA (El Servicio Nacional de Sanidad Agraria, Argentina), 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 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 $1 \times 10^7 \text{ ml}^{-1}$ 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 de 1×10^7 a $2,01 \times 10^6$ (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.

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

III. OBJETIVOS.

General:

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

Específicos:

- Evaluar la sobrevivencia de la bacteria *Azospirillum* spp. en 7 soportes sólidos y 4 soportes líquidos.
- Elaborar un análisis de costos de producción de los tratamientos.

IV. HIPOTESIS

H₀: Los soportes sólidos y líquidos no influyen en la sobrevivencia de la bacteria *Azospirillum* spp.

V. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1. MATERIALES

5.1.1. Materiales de laboratorio

Cajas Petri, matraces, erlenmeyers, vasos de precipitación, tubos, micro-pipetas, espátulas, papel absorbente, papel aluminio, gradillas, mechero, tips plásticos, azas, triángulos de dispersión, varillas de agitación, tamiz, fundas de polifan, bandejas metálicas.

5.1.3. Reactivos:

Estos se presentan en el Anexo 4.

5.2. METODOLOGÍA:

5.2.1. Características del sitio experimental

La presente investigación se realizará en los Laboratorios del Departamento Nacional de Protección Vegetal de la Estación Experimental Santa Catalina del Instituto Nacional Autónomo de Investigaciones Agropecuarias (INIAP), ubicado en:

Provincia: Pichincha
Cantón: Mejía
Parroquia: Cutuglagua
Altitud: 3058m
Latitud: 00°22' S
Longitud: 78°33' O

(Rodríguez *et. al.* 2008)

5.2.2. Factores en estudio

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

t1: Turba de Chimborazo + 1% CaCO₃ + 3% raíz de maíz.- Se empleará 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 será 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 será agregada con la finalidad de brindar un ambiente nativo a la bacteria y como opción al aprovechamiento de los residuos después de la cosecha.

t2: Turba con vermiculita.- Además de contar con las propiedades de la turba, la vermiculita, conocida por su baja densidad aparente y elevada porosidad, dotará a la bacteria una mayor área específica donde desarrollarse.

t3: Humus de lombriz.- Se utilizará como nueva alternativa de soporte sólido, tomando en cuenta su alto contenido de materia orgánica y su procedencia a partir del tratamiento de residuos.

t4: Zeolita liofilizada.- 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. La técnica de liofilización se plantea con el fin de lograr que la mortalidad celular sea muy baja o nula.

t5: Turba de Chimborazo liofilizada.- Este tratamiento se plantea con la finalidad de realizar comparaciones con el tratamiento anterior.

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

t7: Carboximetilcelulosa.- Es un material que tiene la capacidad de encapsular a la bacteria, proporcionar energía y a la vez actuar como un elemento adherente al momento de la inoculación a la semilla.

En el caso de los inoculantes líquidos el soporte lo constituye el medio de cultivo. (Milián y Labandera; 2001). Así se empleará:

t8: Solución Acido Málico.- Al ser específico para *Azospirillum*, nos 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 carbono, nitrógeno y macronutrientes como Ca, Mg, K y Na.

t10: Solución de melaza 8%.- Será empleada como proveedor de energía a la bacteria, por su altísimo contenido de hidratos de carbono además de vitaminas del grupo B y abundantes minerales, entre los que destacan el hierro, cobre y magnesio, y como adherente para el momento de inoculación a la semilla.

t11: Solución aproximada a biofertilizante comercial.- Se utilizará, 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.

Por lo anteriormente mencionado se establecen las siguientes alternativas, como medios portadores o soportes para la bacteria *Azospirillum* spp.

Soportes sólidos

- t1 = Turba de Chimborazo + 1% CaCO₃ + 3% raíz de maíz
- t2 = Turba con vermiculita
- t3 = Humus de lombriz
- t4 = Zeolita liofilizada
- t5 = Turba de Chimborazo liofilizada
- t6 = Alginato
- t7 = Carboximetilcelulosa

Soportes líquidos

- t8 = Solución Acido Máfico
- t9 = Caldo nutritivo
- t10 = Solución de melaza 8%
- t11 = Solución aproximada a biofertilizante comercial

5.2.3. Tratamientos

Los tratamientos estarán constituidos por 7 soportes sólidos y 4 líquidos.

5.2.4. Unidad experimental

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

5.2.5. Diseño experimental

Se utilizará un Diseño Completamente al Azar (DCA) con 5 observaciones y se realizará comparaciones ortogonales entre los tratamientos.

5.2.6. Análisis estadístico

Tabla 1. Esquema del Análisis de Varianza

FUENTES DE VARIACION	GRADOS DE LIBERTAD
Total	54
Tratamientos	10
Error	44

5.2.7. Análisis funcional

Se calculará el coeficiente de variación, se lo expresará en porcentaje y se realizará la prueba de Tukey al 5% para los tratamientos que presenten significación.

5.2.8. Análisis de costos

Se evaluará el costo de producción de cada tratamiento, que se establece como: Materia prima + Mano de obra + Gastos indirectos (Díaz, 2006).

5.3. VARIABLES Y MÉTODOS DE EVALUACIÓN

Las siguientes variables y métodos de evaluación se determinarán 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.

5.3.1. Supervivencia

La evaluación de la supervivencia de *Azospirillum* spp. se realizará tomando 1g de cada soporte sólido o 1ml en el caso de los soportes líquidos y se colocará en 9 ml de agua destilada estéril. Se prepararán diluciones a partir de cada unidad experimental (soporte inoculado) desde 1×10^{-2} hasta 1×10^{-6} en tubos con 9ml de agua destilada. De cada dilución se sembrará 0.1ml en una caja Petri con medio Ácido Máfico - Rojo Congo y transcurridos 7 días de incubación a 32°C se determinará 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 cuantificarán las células encapsuladas disolviendo 1g de esferas en citrato de sodio a 0.1 Molar y de este se harán diluciones desde 1×10^{-2} hasta 1×10^{-10} en tubos con 9ml de solución salina al 0,85% (Pérez *et al.*, 2002) y se procederá de igual manera que en los casos anteriores hasta el conteo en placa.

5.3.2. pH

El pH se medirá pesando 10g de cada soporte sólido inoculado al cual se le agregará 25ml de agua destilada. Se empleará un pH-metro previamente calibrado. En el caso de los inoculantes líquidos se medirá directamente en la solución.

5.3.3. Porcentaje de materia orgánica en soportes sólidos

Para la determinación de materia orgánica, se empleará un crisol previamente esterilizado y pesado, donde se depositarán 3g. de soporte (Peso 1), luego se introducirá en la mufia a 500-600°C durante 6 a 8 horas y se reportará un peso final (Peso 2) (Steugbing L. *et al.* 2001):

$$g. \text{ Materia Orgánica} = \frac{\text{Peso 1} - \text{Peso 2}}{\text{Peso 1}} * 100$$

5.3.4. Porcentaje de contaminación

Esta variable se evaluará contabilizando el número total de colonias bacterianas que se presenten en las cajas empleadas para la prueba de sobrevivencia, el cual representará el 100% de la población, posteriormente se contará el número de colonias que no pertenezcan al género *Azospirillum*, que corresponderá al porcentaje de contaminación.

5.4. MANEJO ESPECÍFICO DEL EXPERIMENTO

En primer lugar se realizará una caracterización de las turbas, humus de lombriz y zeolita, que consistirá en un análisis de elementos totales (N, P, K, Mg, S, Fe, Na y C), porcentaje de materia orgánica y capacidad de retención de humedad. Para continuar con la reactivación y purificación de la cepa de *Azospirillum* spp. proveniente de la Provincia de Bolívar y almacenada en el Banco de Bacterias Diazotróficas del INIAP-EESC, para luego producir la suspensión bacteriana que se empleará en la inoculación de soportes sólidos y líquidos. Estos procedimientos se detallan en el Anexo 3.

VI. CRONOGRAMA

ACTIVIDADES	MESES											
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Elaboración del anteproyecto	■											
Aprobación del anteproyecto		■										
Reactivación y purificación de la Ceba de <i>Azospirillum</i> spp.		■	■									
Análisis preliminares			■	■								
Pretratamiento de soportes			■	■								
Caracterización de materiales sólidos a emplearse como soportes			■	■								
Preparación de tratamientos (soportes) en fundas de polietileno			■	■								
Fermentación y producción del inóculo líquido			■	■								
Inoculación de soportes sólidos				■	■							
Inoculación de soportes líquidos				■	■							
Toma de información					■	■	■	■	■	■	■	
Tabulación de datos					■	■	■	■	■	■	■	
Redacción del informe técnico											■	■
Presentación informe final												■

VII. PRESUPUESTO

Código	Concepto	Unidad	Cantidad	Costo unitario USD	Costo Total USD
730810 001	MATERIALES PARA LABORATORIO Y USO MÉDICO				
730810 001	Cajas Petry plasticas	Funda x 20	50	2.30	115.00
730810 001	Tips plásticos para micro pipeta de 1 ml	Funda x 1000	1	12.15	12.15
730810 001	Tips plásticos para micro pipeta de 0.1 ml	Funda x 1000	1	9.98	9.98
730810 001	Cajas porta tips para micro pipeta de 1 ml	unidades	2	3.50	7.00
730810 001	Cajas porta tips para micro pipeta de 0.1ml	unidades	2	3.50	7.00
730810 001	Guantes quirúrgicos talla M	caja x 100	1	5.62	5.62
730810 001	Mascarillas	paquete x 20	3	19.50	58.50
730810 001	Gradilla	unidades	1	18.20	18.20
730810 001	Jeringuilla 20ml	Caja x 50	2	10.04	20.08
730810 001	Papel parafilm	Rollo x 38m	3	27.99	83.97
730810 001	Picetas 500ml	unidades	2	2.50	5.00
730810 001	Vasos de precipitación pirex de 1000 ml	unidades	2	5.79	11.58
730810 001	Vasos de precipitación pirex de 500 ml	unidades	2	3.61	7.22
730810 001	Botella de 1000ml	unidades	2	6.90	13.80
730810 001	Tubos de ensayo medianos con tapa	unidades	50	0.59	29.50
730810 001	Micropipeta	unidades	1	370	370
730810 001	Alcohol antiséptico	galón	3	6.15	18.45
730810 001	Alcohol industrial	galón	3	9.60	28.80
730810 001	D-L. Ácido Málico	gramos	150	0.48	72.00
730810 001	MgSO ₄ 7H ₂ O	gramos	6	0.07	0.42
730810 001	K ₂ HPO ₄	gramos	15	0.23	3.45
730810 001	NaCl	gramos	25	0.36	9.00
730810 001	KOH	gramos	130	0.18	23.40
730810 001	FeCl ₃ 6H ₂ O	gramos	2	0.03	0.06
730810 001	Peptona bacteriana	gramos	35	0.30	10.50
730810 001	Extracto de Levadura	gramos	15	0.32	4.80
730810 001	Extracto de carne	gramos	5	0.33	1.65
730810 001	Bacto agar	gramos	400	0.64	256.00
730810 001	Rojo Congo	gramo	1	2.00	2.00

730805 001	MATERIAL DE ASEO				
730805 001	Papel toalla	rollo	6	4,48	26.88
730814 001	SUMINISTROS PARA ACTIVIDADES AGROPECUARIAS, PESCA Y CAZA				
730814 001	Sustrato con vermiculita	funda x 20kg	1	40.00	40.00
730814 001	Turba de Chimborazo	Quintal	1	4.00	4.00
730814 001	Humus	Quintal	1	10.00	10.00
730814 001	Melaza	Galón	1	8.00	8.00
730814 001	Zeolita	funda	1	2.00	2.00
730814 001	Fundas de polipropileno grandes	unidades	500	0.05	25
730814 001	Fundas de polietileno 3 x 6 pulg	paquete x 100	5	0,50	2.5
730212 001	INVESTIGACIONES PROFESIONALES Y EXÁMENES DE LABORATORIO				
730212 001	Análisis de suelos		4	10.20	40.80
730212 001	Análisis de minerales totales		1	12.50	12.50
730212 001	Análisis de Carbohidratos		1	15.00	15.00
730212 001	pH		1	2.00	2.00
730212 001	Nitrógeno		1	5.50	5.50
730804 001	MATERIALES DE OFICINA				
730804 001	Marcador permanente punta fina	unidad	3	2.00	6.00
730804 001	Marcador tiza líquida punta gruesa	unidad	3	0.85	2.55
730804 001	Lápices	unidades	3	2.00	6.00
730804 001	Carpetas	unidad	3	1.00	3.00
730804 001	Libro de campo	unidad	1	5	5
730804 001	Resmas de papel	paquete	5	5	25
730204 001	EDICIÓN, IMPRESIÓN, REPRODUCCION, PUBLICACIONES				
730204 001	Impresiones	unidad	1000	0.1	100
730204 001	Empastados	unidad	4	50	200
710510 001	Sueldo tesista	mes	12	380	4560
	SUBTOTAL COSTOS				6306.86
	IMPREVISTOS	5%			315.34
	TOTAL				6622.20

VIII. BIBLIOGRAFIA

- AGUADO, A. y MORENO B, 2008. Potencial de bioinoculantes microbianos como una alternativa para reducir costos de fertilización en maíz de temporal. Guanajuato-México. Pp.13..
- 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 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 a 3
- BURDMAN S.; G. Dulguerova; Y. Okon and E. Jurkevitch. 2001. Purification of the Major Membrane Protein of *Azospirillum brasilense*, Its Affinity to Plant Roots, and Its Involvement in Cell Aggregation. The American Phytopathological Society. Vol 14, N° 4 pp: 555-561
- CIAT, 1988. Manual de métodos de evaluación, selección y manejo, Proyecto Especial CIAT- UNDP
- DÍAZ Martell, 2006. Fundamentos de Costos; http://www.mailxmail.com/curso_fundamentos_costos/costo_producción
- 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.
- 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. pg.25-49.
- FALLICK, E. and 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. http://www.engormix.com/inoculacion_con_azopirillum_brasilense_s_articulos_1159.AGR.htm
- GALAL Y., El-Ghandour, S. Aly, S. Soliman, A. y Gadalla. 2000. Non-isotopic method for the quantification of biological nitrogen fixation and wheat production under field conditions. Biol Fertl Soil 32:47-51.
- GAVANDE S.; 1986; Física de suelos, principios y aplicaciones; Editorial Limusa; México -- México D.F; pg 160.

- CIRARD, H. y ROUGIEX, R. 1964. Técnica de Microbiología Agrícola. Zaragoza – España. Pág. 244. Pág 27.
- HORWATH W. and E.A.PAOL. 1994. Microbial Biomass In Methods of Soil Analysis. Part2. Microbiological and Biochemical Properties-SSSA Book Series. N°5.
- MENDEZ M., 2008. Nitrógeno Biológico en Arroz; Argentina: mmendez@corrientes.inta.gov.ar; pp 41.
- MILIÁN A y LABANDERA C. 2001. Calidad de inoculantes comerciales para leguminosas en Uruguay 1993 – 2001. (fp. Chasque.apc.org:8081/microlab/LMSCI/trate/calinoc.htm.)
- 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. pp. 36 a 38.
- NOCETI Juan; 2000; Biofertilizantes - Un nuevo desafío en nuestro país y en la región; Uruguay. pp. 2-5
- 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; <http://www.lanacion.com.ar/nota>.
- RODRÍGUEZ E. y CÁCERES A. 1982. Improved médium for isolation of *Azospirillum* spp.. *Applieta Microbiology and Environmental*. 44(2): 940-991.
- RODRÍGUEZ L., RACINES M. y SEVILLA F. 2008. Boletín Promocional N°20 – Estación Experimental Santa Catalina – Instituto Nacional Autónomo de Investigaciones Agropecuarias, Quito - Ecuador. pg. 6.
- SAURA G.; 2000. Uso de *Azospirillum* sp. en caña de azúcar; FIAGRO; Buenos Aires -- Argentina.
- STEUBING L; GODOY R y ALBERDI M. 2001. Métodos de Ecología Vegetal. Editorial Universitaria. Santiago de Chile. Pp. 121.

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.

YÁNEZ C; ZAMBRANO J; CAICEEDO 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. Pág. 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. Pág. 13

YÁNEZ C., CAICEDO M; NOROÑA J.; CLAVIJO F. y HEREDIA J; 2008. Informe Anual. Programa de Maíz. Estación Experimental Santa Catalina; INIAP, Quito, Ecuador. Pág. 6.

ANEXOS

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

<i>Reactivos</i>	<i>Cantidad</i>
Acido 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

<i>Reactivos</i>	<i>Cantidad</i>
Agua destilada	400 ml
Rojo – Congo	1 g

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

<i>Reactivos</i>	<i>Cantidad</i>
Peptona	1 g
Agua destilada	100 ml

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

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

Anexo 4. Reactivos que serán utilizados en la investigación.

Alcohol antiséptico, alcohol industrial 95 – 96%, Sulfato de Magnesio Heptahidratado (MgSO₄ 7H₂O), Cloruro de Sodio (NaCl), Fosfato de Potasio Dibásico (K₂HPO₄), Carbonato de Calcio (CaCO₃), Cloruro Férrico Hexahidratado (FeCl₃ 6H₂O), Extracto de Levadura, Solución Buffer para pH 7, Agar-Agar, D-L Ácido Málico, Hidróxido de

Potasio (KOH), Rojo Congo, Extracto de carne, Peptona bacteriana, Agua destilada, Agua estéril.

Anexo 5. Metodología para la caracterización de materiales empleados para soportes sólidos, reactivación, purificación, producción de la suspensión bacteriana y preparación de inoculantes sólidos y líquidos de *Azospirillum* spp.

1. Caracterización de material empleado para soportes sólidos

Se aplicará a la turba de Tambohuasha, turba con vermiculita, Humus de lombriz y zeolita. Se realizará un análisis de elementos totales, (N, P, K, Mg, S, Fe, Na y C) y porcentaje de materia orgánica de acuerdo a la metodología establecida en el laboratorio de Suelos y Aguas del INIAP.

Además se calculará la capacidad de retención de humedad, que está directamente relacionada con el tamaño de partícula y la materia orgánica del sustrato. Por ende, se requiere conocer el porcentaje de las partículas del tamaño de Arena, Limo y Arcilla de la muestra, conociendo que el diámetro de partícula es de 50-2000 μ m, 2-50 μ m y < 2 μ m, respectivamente, se procederá a tamizar el sustrato a través de un tamiz de 53 μ m, el producto retenido en este tamiz corresponderán a las partículas del tamaño de arena. Las partículas obtenidas a la salida del tamiz se someterán a un nuevo tamizado a través de 2 μ m, donde el producto retenido corresponderá a partículas del diámetro de limo y las que pasen a través de éste, serán partículas del tamaño de arcilla, finalmente se pesarán los diferentes materiales obtenidos, se calculará su correspondiente porcentaje y los resultados serán ingresados al programa de simulación SPAW (Soil-Plant-Air-Water) de la Universidad Estatal de Washington, a partir del cual se obtendrán el punto de marchitez y capacidad de campo y al relacionar con el porcentaje de materia orgánica, nos dará como resultado el porcentaje de retención de humedad, conociendo que el nivel óptimo para el desarrollo de microorganismos es del 55% (Horwath y Paol, 1994), se conocerá el volumen de agua estéril que deberá adicionarse en los soportes sólidos, para alcanzar el porcentaje de retención de humedad requerido.

2. Reactivación y purificación de cepas

Previamente se prepararán los medios de cultivo: Ácido Málico – Rojo Congo sólido para el aislamiento y purificación (Anexo 1) (Rodríguez y Cáceres 1982), Peptona al 1 % para la reactivación (Anexo 2) (CIAT, 1988) y Caldo Nutritivo para la fermentación (Anexo 3) (Girard y Rougieux 1964). Una vez elaborados los medios se autoclavan junto con materiales de vidrio, asas, agua destilada, etc. a 15 PSI a 121°C, durante 20 min.

Para la reactivación se colocará 1ml de peptona al 1%, en tubos eppendorf que contendrán la cepa C2-Bolívar liofilizada, posteriormente se someterá a agitación en un vórtex hasta homogenizar la mezcla, a continuación se tomará 50 μ l de la cepa y se colocará en cajas petri con medio Ácido Málico – Rojo Congo sólido, para proceder a inocular mediante la técnica de dispersión en placa, luego se incubará a 32°C por 7 días, tiempo en el cual se podrán observar colonias de *Azospirillum* spp. de color rojo escarlata intenso, dichas colonias se aislarán mediante estriado en cajas petri con medio Ácido Málico – Rojo Congo sólido, para finalmente incubarlas por 7 días a 32°C y obtener colonias puras de la

bacteria. Para confirmar que el nuevo cultivo corresponde a *Azospirillum* spp. se realizará tinción de Gram (Girard y Rougieux, 1964).

3. Producción de suspensión bacteriana

Se seleccionarán cultivos puros de la cepa C2-Bolívar de *Azospirillum* spp. que se encuentran en medio de cultivo Ácido Máfico - Rojo Congo, se agregará 2ml de caldo nutritivo y con la ayuda de un triángulo de vidrio se procederá a desprender la bacteria del medio. de ésta mezcla se transferirán 50 μ l a un matraz que contendrá 40 ml de caldo nutritivo.

La cepa se propagará en agitación rotatoria a 120 rpm a 19°C durante 8 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 la propagación bacteriana en un tubo de precipitación estéril. La muestra se someterá a 540 nm. y al obtenerse un valor de 1 en absorbancia, indicará que ésta contiene aproximadamente 1×10^9 UFC/ml según lo descrito por Bashan, 1997, posteriormente en un tubo de ensayo estéril se colocará 1 ml de la propagación bacteriana y 9 ml de solución salina (Girard y Rougieux, 1964) al 0.85% para diluirlo a 1×10^8 UFC/ml. Esta dilución se transferirá a un matraz con 90 ml de solución salina al 0.85%, para obtener la dilución 1×10^7 UFC/ml (Fallick y Okon, 1996).

4. Preparación de inoculantes sólidos

Los diferentes materiales se secarán a 40°C por dos días, luego se molerá y se tamizará en un tamiz de 180 μ m, para posteriormente elaborar los soportes con diferentes cantidades de cada uno de los materiales. El empaqueo de los soportes se realizará en fundas de polietileno y en cada una de ellas se verterá 30ml del material procesado de acuerdo a las proporciones planteadas para los diferentes tratamientos (se prepararán veinte y cinco fundas de cada tratamiento, de las cuales se utilizarán cinco para cada evaluación de datos). Las fundas selladas serán esterilizadas en el Departamento de Ciencias Nucleares de la Escuela Politécnica Nacional, mediante el acelerador de electrones, para evitar cambios en la química de los soportes. La impregnación del inoculante líquido en los soportes sólidos se realizará mediante la inyección de suspensión bacteriana que contendrá 1×10^7 UFC/ml (Yáñez *et al.*, 2004). el volumen de inóculo líquido que se inyectará, dependerá del soporte a utilizarse, ya que cada uno debe alcanzar un porcentaje de retención de humedad de 55%. las fundas serán nuevamente selladas y los soportes inoculados se incubarán a 37°C por 8 días, periodo en el cual se realizarán movimientos con el fin de homogenizar el material, transcurrido este tiempo se llevarán a refrigeración 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 serán almacenados a temperatura ambiente.

Para la preparación de los soporte sólidos liofilizados se procederá de la misma manera que en los casos anteriores, hasta los 8 días en refrigeración, luego de éste tiempo se

abrirán las fundas asépticamente, se cubrirán con papel filtro estéril y serán colocadas dentro de los envases de liofilización y éstos a su vez se acoplarán al liofilizador durante 5 días. Transcurrido éste periodo se sellarán las fundas y serán almacenadas a temperatura ambiente.

Para la Inmovilización de células se preparará Alginato de Sodio al 2% y 3%, y se mezclarán con las células. Con la ayuda de una jeringa se tomarán alícuotas de la mezcla alginato/células y se dejarán caer en el cloruro de calcio a 0.2 Molar, las esferas obtenidas se mantendrán en reposo por 30 minutos (Pérez *et al.*, 2002).

El soporte a base de carbiximetilcelulosa (CMC) es una variante de los casos anteriores, en este se inoculará 20ml de suspensión bacteriana en 5g de CMC. (Aguado y Moreno; 2008).

5. Preparación de inoculantes líquidos

La preparación de la solución en base a biofertilizante comercial parte del análisis de minerales totales, nitrógeno total, pH y azúcares del biofertilizante comercial, NoctinAzo y de acuerdo a los resultados obtenidos se preparará una solución semejante a esta.

Una vez que los soportes líquidos estén preparados. Se procede de la misma manera que en la producción de la suspensión bacteriana, hasta que se obtiene una concentración de 1×10^9 ufc/ml. Posteriormente en un tubo de ensayo estéril se colocará 1 ml de la propagación bacteriana y 9 ml del soporte líquido, obteniéndose una concentración de 1×10^8 ufc/ml. de ésta dilución se transferirán 3ml a una funda de polietileno estéril con 27ml de la solución líquida correspondiente, (se prepararán veinte y cinco fundas de cada tratamiento. de las cuales se utilizarán cinco para cada evaluación de datos) se sellará herméticamente y se incubará a 37°C por 8 días. una vez transcurrido este tiempo se refrigerará a 4°C. por 8 días y finalmente serán almacenados a temperatura ambiente.