

Evaluación de cepas nativas de *Azotobacter* spp como agente reductor de urea en el cultivo de caña de azúcar (*Saccharum* spp).

Lina Carmenza Valderrama Aguirre

*Universidad del Valle
Facultad de Ingenierías
Maestría en Ingeniería
Énfasis en Ingeniería Sanitaria y Ambiental
Cali- Valle del Cauca
2013*

Evaluación de cepas nativas de *Azotobacter* spp como agente reductor de urea en el cultivo de caña de azúcar (*Saccharum* spp).

Lina Carmenza Valderrama Aguirre

*Tesis de grado para optar al título de Magister en Ingeniería
Énfasis en Sanitaria y Ambiental*

*Director:
Aldemar Reyes Trujillo
Ingeniero Agrícola (MSc)
Profesor Escuela de Ingeniería de Recursos Naturales y del Ambiente.
Grupo de Investigación en Ingeniería de Recursos Hídricos y Suelos
(IREHISA).
Universidad del Valle*

*Universidad del Valle
Facultad de Ingenierías
Maestría en Ingeniería
Énfasis en Ingeniería Sanitaria y Ambiental
Cali- Valle del Cauca
2013*

UNIVERSIDAD DEL VALLE
FACULTAD DE INGENIERIAS
PROGRAMA ACADÉMICO DE MAESTRÍA EN INGENIERÍA
ÉNFASIS EN INGENIERÍA SANITARIA Y AMBIENTAL

LINA CARMENZA VALDERRAMA AGUIRRE, 1983.

**Evaluación de cepas nativas de *Azotobacter* spp
como agente reductor de urea en el cultivo de caña
de azúcar (*Saccharum* spp).**

Tema:

Azotobacter sp

Biofertilizante

Caña de azúcar

Nitrógeno

Nota de Aprobación

El trabajo de grado titulado “Evaluación de cepas nativas de *Azotobacter* spp como agente reductor de urea en el cultivo de caña de azúcar (*Saccharum* spp).”, presentado por la estudiante LINA CARMENZA VALDERRAMA AGUIRRE, para optar al título como Magister en Ingeniería; Énfasis en Sanitaria y Ambiental, fue revisado por el jurado y calificado como:

Aprobado

Director

Aldemar Reyes Trujillo

Ingeniero Agrícola (MSc)

Jurado

DEDICATORIA

A Dios por cumplir con todas sus promesas.

A mi madre Hortensia Helena Aguirre Obando, por ser mi ángel, has cumplido tu misión con honores.

A mi padre Hernando E. Valderrama, por su apoyo y oportunos consejos.

A todos los que nunca se cansaron de confiar en mí, especialmente a mi abuela Carmen Rosa Obando de Aguirre, hermanos Augusto Valderrama y Hernando E. Valderrama.

A todos esos amigos, compañeros y hermanos de corazón por su incondicional cariño.

LINA CARMENZA

AGRADECIMIENTOS

A Dios por ser más que una razón, eres mi mejor amigo y el artífice de lo que soy.

A mi madre, por todos sus esfuerzos e infinito amor.

A mis profesores de la Universidad del Valle, Aldemar Reyes y otros que llenaron mi mente y espíritu de riqueza intelectual, ética y valores.

A Hernel Marín Salgado por ser mi hermano académico.

A INCAUCA S.A. por la oportunidad que me brinda siempre.

Al Dr. Carlos Moreno Biometrista de CENICAÑA por toda su colaboración y amistad.

A mis estudiantes David Fernando Posso, Jairo Alexander Muñoz y todos los que hoy continúan conmigo.

A mi equipo de trabajo del Laboratorio de Microorganismos de campo por perseguir conmigo este sueño.

TABLA DE CONTENIDO

1	RESUMEN	14
2	INTRODUCCIÓN	15
3	PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	17
3.1	Formulación del problema y justificación	17
3.2	Antecedentes	20
4	MARCO TEORICO.....	21
4.1	Generalidades sobre el cultivo de caña de azúcar	21
4.1.1	Fisiología del cultivo	22
4.1.2	Distribución de suelos	23
4.1.3	Fertilización	23
4.2	El ambiente rizosferico.....	25
4.2.1	Bacterias promotoras de crecimiento (PGRs).	26
4.2.2	Bacterias fijadoras de nitrógeno o diazotroficas - Fijación Biológica de Nitrógeno(FBN).	27
4.3	Generalidades sobre <i>Azotobacter</i> spp	28
4.3.1	Medios de cultivo para bacterias diazotróficas como <i>Azotobacter</i> sp	31
4.4	Métodos moleculares para identificar presencia de genes fijadores de nitrógeno.	31
5	OBJETIVOS	32
5.1	OBJETIVO GENERAL.....	32
5.2	OBJETIVOS ESPECIFICOS.....	32
6	METODOLOGÍA.....	33
6.1	Aislamiento e identificación de cepas nativas	33
6.1.1	Localización	33
6.1.2	Muestreo.....	34
6.1.3	Aislamiento primario.....	35
6.1.4	Aislamiento secundario.....	36
6.1.5	Macroscopía y microscopia.....	36
6.1.6	Conservación de los aislamientos	37
6.1.7	Pruebas bioquímicas	37
6.2	Selección de las cepas de <i>Azotobacter</i> spp eficientes	38
6.2.1	Velocidad de crecimiento.....	39
6.2.2	Crecimiento en vinaza	39
6.2.3	Síntesis de compuestos indólicos- producción de ácido indolacético (AIA)	40
6.2.4	Actividad y reducción de acetileno (ARA).	41
6.2.5	Identificación molecular para el gen <i>nifH</i> ; como prueba confirmativa de la enzima nitrogenasa usando los primers CVV e IGK.	43
6.3	Evaluación del efecto promotor de las cepas seleccionadas y su relación con las dosis de urea en plántulas.....	44
6.3.1	Preparación del inoculo para pruebas en campo	44
6.3.2	Material vegetal	45
6.3.3	Determinación de la fertilización nitrogenada.....	46

6.3.4	Elección de la mejor combinación de factores.	48
7	RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	50
7.1	Aislamiento e identificación de cepas nativas.	50
7.1.1	Muestreo de suelos y aislamiento primario.....	50
7.1.2	Aislamiento secundario, Macroscopía y Microscopía.....	51
7.1.3	Pruebas Bioquímicas.	52
7.2	Discriminación de las cepas de Azotobacter spp eficientes para el proceso.....	53
7.2.1	Crecimiento bacteriano.....	53
7.2.2	Crecimiento en vinaza	56
7.2.3	Síntesis de compuestos indólicos- producción de ácido indolacético (AIA).	57
7.2.4	Actividad de reducción de acetileno por cromatografía de gases (ARA).....	59
7.2.5	Identificación molecular para gen nifH; como prueba confirmativa de la enzima nitrogenasa usando los primers CVV e IGK.....	60
7.3	Evaluación del efecto promotor de las cepas seleccionadas y su relación con las dosis de urea en semillas de caña.	62
7.3.1	Altura de brotes.	62
7.3.2	Pesos Secos	66
7.3.3	Nitrógeno foliar	72
8	CONCLUSIONES	74
9	RECOMENDACIONES	75
10	REFERENCIAS	76
11	ANEXOS	82

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Composición de la caña de azúcar moderna (Rodríguez, 2001).	21
Tabla 2. Cepas aisladas de caña de azúcar en diferentes estudios(Rodríguez C. <i>et al.</i> , 2005).	26
Tabla 3. Movilidad, formación de filamentos y pruebas bioquímicas utilizadas para la caracterización del género <i>Azotobacter</i> spp (Avella, 2007).....	30
Tabla 4. Análisis fisicoquímico del suelo del cultivo; Laboratorio fisicoquímico de suelos Ingenio Providencia S.A.....	34
Tabla 5. Volúmenes inyectados para curva de calibración de etileno.	42
Tabla 6. Análisis de suelos Laboratorio de suelos del Ingenio Providencia S.A	45
Tabla 7. Resumen diseño del experimento.	46
Tabla 8. Resumen normalidad de los datos; usando la prueba de Shapiro-Wilk.....	49
Tabla 9. Macroscopía y microscopias de aislamientos encontrados por ubicación en la planta. ...	52
Tabla 10. Pruebas bioquímicas para las cepas presuntivas.	53

INDICE DE FIGURAS

Figura 1. a. Fluctuación de la tasa de fotosíntesis con la edad del cultivo de caña de azúcar b. Relación entre la tasa de asimilación de CO ₂ (Fotosíntesis) de la caña y la disponibilidad de luz a varias edades del cultivo. Fuente: (Estévez et al., 1995).....	22
Figura 2. Acumulación de N en tallos y hojas de caña de azúcar var. RB 85-5035. Las barras verticales del total indican el error estándar (no visibles cuando son menores que el marcador) Fuente: (Rengel et al., 2011).	25
Figura 3. a. Aislamiento de <i>Azotobacter</i> spp en medio semi-sólido b. microscopio 1000x (Aguero M., 2009).	29
Figura 4. Esquema ubicación espacial.	33
Figura 5. Esquema muestreo de suelos (CENICAÑA 2009).	34
Figura 6. Obtención de bacterias presuntivas de <i>Azotobacter</i> sp.	35
Figura 7. Macroscopía y Microscopía de los aislados.	37
Figura 8. Aislados en medio Ashby a. Presuntiva <i>Azotobacter</i> sp cinco días de siembra b. aislado con 15 días de siembra c. observación de halos de solubilización de calcio d. oscurecimiento de aislados e. observación de los aislados, bacilos Gram – cortos f. Kit de pruebas bioquímicas.	38
Figura 9. Metodología diluciones seriadas y recuento en placa	39
Figura 10. Medio de cultivo con vinaza para el crecimiento de microorganismos.	40
Figura 11. Curva de calibración producción de compuestos indólicos.	41
Figura 12. Curva de calibración de etileno por cromatografía de gases.	42
Figura 13. Lectura cromatógrafo de gases. a. Cromatograma mostrando conversión de acetileno a etileno. b. control (-) donde no se observa conversión de gases.	43
Figura 14. Método de siembra de las semillas de caña de azúcar.	45
Figura 15. Acomodación de las unidades experimentales en condiciones de vivero.	48
Figura 16. Número de aislamientos encontrados por ubicación en la planta.	50
Figura 17. Crecimiento por absorbancia.	54
Figura 18. Crecimiento por recuento en placa.	55
Figura 19. Resistencia y crecimiento vinaza.	56
Figura 20. Síntesis de compuestos indólicos en ug/ml de las cepas evaluadas.	58
Figura 21. Conversión de acetileno a etileno y tasa de nitrógeno fijado por hora.	60
Figura 22. Amplificación del gen nif H en los aislamientos.	61
Figura 23. Altura 30 días después de la siembra (DDS) por tratamiento.	62
Figura 24. Altura 60 días después de la siembra por tratamiento.	63
Figura 25. Altura 90 días después de la siembra por tratamiento.	63

Figura 26. a. Diferencias significativas entre tratamientos favoreciendo la bacteria 2. b. Diferencias significativas entre dosis de urea siendo mejor 50% de la dosis.	64
Figura 27. Inoculación de la bacteria dos en plantas de caña de azúcar.	65
Figura 28. Peso seco de la raíz 90 días después de la siembra por tratamiento.....	66
Figura 29. Diferencias significativas por tratamiento.	67
Figura 30. Observación de las plantas inoculadas con la bacteria dos, detalle de crecimiento radicular.	67
Figura 31. Peso seco tallos 90 días después de la siembra por tratamiento.	68
Figura 32. Diferencias significativas por tratamiento.	69
Figura 33. Peso Seco de las hojas 90 días después de la siembra por tratamiento.....	70
Figura 34. Diferencias significativas por tratamiento.	71
Figura 35. Porcentaje de nitrógeno en hojas 90 días después de la siembra por tratamiento.	72
Figura 36. Diferencias significativas por tratamiento.	73

INDICE DE ECUACIONES

Ecuación 1	15
Ecuación 2	46

LISTA DE ANEXOS

ANEXO 1. MEDIO AGAR ASHBY (POR COMPONENTES).	82
ANEXO 2. CALDO NUTRITIVO MERCK ®.	82
ANEXO 3. PREPARACIÓN DE AZÚCARES MERCK ®.	82
ANEXO 4. PRUEBA DE OXIDASA Y CATALASA.	82
ANEXO 5. CALDO TRIPTICASA SOYA (TSB) MERCK ®.	83
ANEXO 6. REACTIVO DE SALKOWSKY.....	83
ANEXO 7. CALDO TRIPTÓFANO.	83
ANEXO 8. ANOVA PARA ALTURA DE BROTES.	84
ANEXO 9. ANOVA PARA PESO DE RAICES.....	85
ANEXO 10. ANOVA PARA PESO DE TALLOS.....	88
ANEXO 11. ANOVA PARA PESO DE HOJAS.....	91
ANEXO 12. ANOVA PARA NITROGENO FOLIAR.....	94
ANEXO 13. ANÁLISIS FÍSICOQUÍMICO DE VINAZA.	97
ANEXO 14. PROTOCOLO DE EXTRACCIÓN DE ADN.....	98

1 RESUMEN

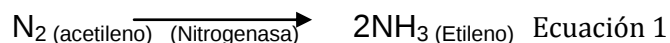
El nitrógeno es uno de los fertilizantes más importantes en la industria azucarera del mundo, debido a que es un cultivo altamente extractivo; en Colombia es adicionado principalmente en forma urea; sin embargo; actualmente se han venido desarrollado tecnologías sostenibles que permitan reducir los impactos negativos por las pérdidas de nitrógeno; una opción de mucho interés es el uso de microorganismos diazótrofos que no solo fijan nitrógeno sino que tienen propiedades enraizadoras y biocontroladoras. El propósito de este trabajo fue evaluar cepas nativas de *Azotobacter* spp como agente reductor de urea en el cultivo de caña de azúcar (*Saccharum officinarum* L. (CC 85-92)). Se tomaron muestras de raíces, tallos y hojas de caña; donde se obtuvieron 25 cepas, de las cuales cinco cumplían con las características macro y microscópica y bioquímicas de *Azotobacter* sp. Finalmente, se seleccionaron dos cepas que fueron las más eficientes de acuerdo a la tasa de crecimiento, producción de compuestos indólicos, resistencia a la vinaza y reducción de acetileno (ARA). Estas fueron evaluadas en caña de azúcar a nivel de vivero bajo diferentes concentraciones de urea (100, 75, 50 y 0%), con un diseño factorial de tres repeticiones, donde la altura de la planta se evaluó cada 30 días después de la siembra hasta la fase de macollamiento a los 90 días. Adicionalmente, se evaluó el peso de la raíz al final del experimento, el peso del tallo, hojas y porcentaje de nitrógeno foliar. Se pudo establecer una relación inversa entre la cantidad de fertilizante y el efecto promotor de crecimiento de las bacterias ($p < .0001$); mostrando mejores resultados para la combinación bacteria dos (2) y 50% de urea. En conclusión la aplicación de las bacterias fue significativamente más efectiva estimulando el crecimiento de la caña de azúcar con una menor dosis de fertilizante. Por lo tanto se recomienda realizar experimentos a mayor escala que incluyan la evaluación de costo efectividad y producción en los cultivos.

2 INTRODUCCIÓN

La industria azucarera constituye un renglón importante para la economía de diversos países de la región tropical de América Latina y el Caribe. En Colombia la mayor concentración de cultivo se encuentra ubicada en el valle geográfico del río Cauca, el cual posee las condiciones agroecológicas ideales para el desarrollo del cultivo y donde actualmente se registran aproximadamente 227.748 (Informe anual CENICAÑA, 2012) hectáreas dedicadas a la explotación de caña de azúcar, con una producción promedio de 120 ton / ha (Palma *et al.*, 2010).

Por tratarse de un área tan extensa del valle y sumado al hecho de que es un monocultivo posee altos requerimientos nutricionales en consideración a su elevada capacidad de extracción y remoción de nutrientes del suelo, y a su alta producción de materia verde y seca; por esto el manejo de la nutrición es un aspecto crucial desde el punto de vista fisiológico y económico (Subiros, 1998). Para suplir las necesidades del cultivo se recurre a fertilizantes sintéticos que contribuyen a la contaminación por lixiviación, volatilización, fijación, entre otros; este impacto negativo ha generado el desarrollo de tecnologías que involucran microorganismos benéficos y efectivos, los cuales tienen la capacidad de favorecer procesos esenciales para la nutrición de las plantas (Avella, 2007).

Dentro de los microorganismos más usados se encuentra *Azotobacter* spp; el cual por su acción en la fijación de nitrógeno atmosférico se encuentra dentro del grupo de las bacterias diazotróficas, las cuales fijan nitrógeno por la acción del complejo enzimático nitrogenasa, la ecuación 1 muestra la reacción de fijación de nitrógeno por parte de las bacterias fijadoras de nitrógeno (Baca *et al.*, 2000).



Por otra parte *Azotobacter* spp, también, tiene la capacidad de generar hormonas o reguladores de crecimiento, especialmente Ácido Indol Acético (AIA), es por esto que, al mismo tiempo, se le incluye dentro del grupo de bacterias promotoras de crecimiento vegetal o PGPMs (Plant Growth Promoting microorganisms); las cuales se encuentran asociadas a la rizosfera y están relacionadas con mayor número de macollamiento, crecimiento, distancia de entrenudos entre otros (Rojas. & Moreno., 2008), reduciendo de esta manera el uso de agroquímicos y facilitando

una producción económica, además de contribuir en la restauración de ecosistemas (Borda M. *et al.*, 2009).

A pesar de los beneficios citados anteriormente, el resultado de la aplicación de biofertilizantes depende de la capacidad del microorganismo para adaptarse a las condiciones ambientales del lugar donde se aplique, es decir al tipo y características del suelo; por este motivo, es importante el uso de bacterias autóctonas (Echeverría & Koch, 2007). Por lo tanto, el objetivo de este trabajo es obtener cepas nativas de *Azotobacter* spp; debido a que esto permite obtener microorganismos adaptados a las condiciones de los suelos cultivados con caña de azúcar, especialmente condiciones relacionadas con las aplicaciones de la vinaza (subproducto de la industria del alcohol y que por sus propiedades se está usando actualmente como fertilizante líquido, fuente de potasio y materia orgánica).

3 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

3.1 Formulación del problema y justificación

La región del valle geográfico del río Cauca se distingue por su ecología excepcional para la siembra, adaptación, desarrollo y cosecha de la caña de azúcar sin interrupción en el año (Quintero *et al.*, 2008). El territorio cultivado con caña comprende 227.748 ha (Informe anual CENICAÑA, 2012) planas de origen aluvial, recibe un promedio 1291 mm de lluvias distribuido en dos periodos en el año (Informe anual CENICAÑA, 2012). La temperatura media es 25° C., con oscilación de casi 12°C entre el día y la noche, que propicia la concentración de la sacarosa en el tallo de la gramínea (Ramos, 2005). El brillo solar sobrepasa las seis horas diarias, energía que permite mayor actividad fotosintética. La humedad relativa es aproximadamente del 77% (Informe anual CENICAÑA, 2012).

A pesar de las buenas condiciones hidroclimatológicas de la zona, se ha hecho necesario complementar el cultivo con fertilizantes, Gómez & Sánchez, 1968 sostienen que al aumentar la dosis de N aplicado, aumenta significativamente la producción de caña y de azúcar, (Giraldo, 1974) encontró que a la semilla de caña se le debía suministrar de 300 a 500 kg/ha de P y 200 kg/ha de urea; a lo que (Calderón *et al.*, 1997) argumentaron que la dosis óptima de N se encuentra entre 80 y 100 kg/ha, aplicada en un período de 3 meses después de cada corte; actualmente se usan 120 Kg/ha de N, 60 Kg/ha de P y 60 Kg/ha de K en un mollisol (García *et al.*, 2003, Arreola *et al.*, 2004).

Por lo anterior, se dice que el nitrógeno constituye uno de los nutrientes limitantes en el cultivo de la caña de azúcar (Subiros & Bertsch, 1998), sin embargo, las cantidades que se deben aplicar dependen de la fertilidad del suelo que está íntimamente relacionada con el contenido de materia orgánica (MO) presente en este; siendo la MO el factor que más explica las respuestas a las aplicaciones de nitrógeno (Pérez *et al.*, 2008).

De esta forma, las estrategias de fertilización en caña de azúcar se basan en el conocimiento de las respuestas del cultivo a las aplicaciones de N en los diferentes suelos de la región. Entre otros factores que definen las dosis variables de N están, la productividad de las suertes (potencial productivo), la fertilidad del suelo (MO, textura), la edad de la caña y otros relacionados con el manejo y factores del terreno (Pérez *et al.*, 2008).

Pese a las recomendaciones sobre dosificación de fertilizantes; la aplicación en exceso es uno de los más grandes problemas ambientales; en el mundo se producen anualmente unas 400 millones de toneladas de fertilizantes, de las cuales en el mercado de fertilizantes en Colombia se negocian alrededor de 1,5 millones de toneladas (Conpes, 2009).

Un informe del Departamento de Agricultura de Estados Unidos, de 2012, afirma que Colombia aplica 521 kilos por hectárea de fertilizantes, mientras que en América Latina el promedio de aplicaciones de fertilizantes es de 148; en Asia, 85; en el norte de África, 157, y en el África subsahariana, 10. El Banco Mundial ubica a Colombia, luego de China y Malasia y de algunos países con superficies desérticas o insulares, como uno de los primeros en la aplicación de fertilizantes, con 499 kilos por hectárea de tierra cultivable en promedio entre 2008 y 2012 (Conpes, 2009).

En cultivos perennes como la caña, los fertilizantes participan con un porcentaje que abarca entre el 15% hasta el 30% de los costos de producción, adicionalmente, el 94% de las ventas se concentra en seis empresas: Monómeros Colombo Venezolanos S.A (37%), Abonos Colombianos S.A – ABOCOL (20%), Ecofertil S.A (15%), Yara Colombia Ltda (13%), Nutrición de Plantas S.A (5%) y C.I. De Azúcares y Mielles S.A. – CIAMSA (4%); Sin embargo, la producción nacional de materias primas representa una proporción muy pequeña del mercado nacional.

Todo lo anterior, sumado al limitado conocimiento de las fuentes potenciales de dichos minerales como por la limitada capacidad para la explotación y aprovechamiento de los mismos; ha contribuido a que se dependa de las importaciones de fertilizantes y las situaciones externas adversas se transmitan directamente al país. Por lo que entre 2000 y 2007 el país importó en promedio 445.000 toneladas de Urea al año (Conpes, 2009).

Por lo tanto; la aplicación continua de fertilizantes no puede ser una opción sostenida para países en desarrollo, ya que los precios de los energéticos tienden a la alza debido, entre otras, al fuerte incremento que tuvo el precio del petróleo y el gas, ocasionando aumentos sostenidos en los fletes y en los fertilizantes derivados como la Urea. Además este tipo de fertilizantes constituyen contaminantes de los mantos acuíferos y al mismo tiempo la mayoría de estos compuestos minerales se pierden por lixiviación (Baca *et al.*, 2000); en efecto, los gremios de la producción e industriales del sector de fertilizantes argumentan que

han calculado que un 70% de las aplicaciones de nitrógeno se pierden (Conpes, 2009).

Debido a la alta demanda de fertilizantes y sumado a los niveles de contaminación causados por los excesos en la fertilización, se vuelve de gran importancia el planteamiento de investigaciones encaminadas a seleccionar cepas nativas o autóctonas que permitan la elaboración de bio- fertilizantes para reducir el uso de fertilizantes químicos. A nivel mundial, los principales cultivos en los que se vienen utilizando biofertilizantes son algodón, soya, flores y arroz, siendo este último el que emplea la mayor cantidad de este tipo de insumos, logrando reducir hasta en un 50% el uso de fertilizante químico nitrogenado (Corpoica, 2007).

Por lo anterior se espera que esta investigación sea un referente que permita evaluar el potencial en la germinación, y de manera preliminar, en el desarrollo de uno de los cultivos más importantes en el país, la caña de azúcar.

3.2 Antecedentes

Se han realizado diversas investigaciones donde se ha evaluado el efecto de la inoculación en conjunto con la aplicación de niveles intermedios de fertilización con nitrógeno, fósforo y potasio (Okon & Labandera, 1994). En estas investigaciones se ha observado que la inoculación de los cultivos con este tipo de microorganismos permite reducir en 40- 50% el nivel de los fertilizantes sin que exista disminución en el rendimiento de la cosecha (Itzlgshn *et al.*, 2000).

Según (Döbereiner *et al.*, 1995.); “algunas gramíneas como la caña de azúcar asociada con bacterias fijadoras de nitrógeno endófitas pueden crecer casi independiente de la disponibilidad de nitrógeno del suelo” (Lozano *et al.*, 2005); igualmente en el caso del cultivo de la caña de azúcar en Brasil, a diferencia de otros países del mundo, las variedades presentan una baja respuesta a la fertilización nitrogenada, principalmente en el primer ciclo. El potencial de Fijación Biológica Nitrógeno (FBN) en las variedades más eficientes alcanzan hasta el 71% de las necesidades del cultivo (Lozano *et al.*, 2005); a lo que (Baca *et al.*, 2000, Resende *et al.*, 2006) corroboran diciendo que en la asociación de *A. diazotrophicus* con cultivos de caña de azúcar en Brasil, se han descrito rendimientos de fijación de nitrógeno de de 160Kg/N por hectárea, una fijación similar a la observada en las leguminosas.

También, el centro de Investigaciones y Aplicaciones Biotecnológicas de España (IAB) encontró que, el uso de inoculantes a partir de *Azotobacter* spp acorta el período de semillero y ciclo total del cultivo, permitiendo la obtención plantas vigorosas que pueden trasplantarse en menor tiempo. Además, aceleran la floración y fructificación, aumentando el número de flores y frutos e incrementando los rendimientos de las cosechas. Esto permite el ahorro de fertilizantes nitrogenados recomendados en las normas técnicas de varios cultivos (Echeverría & Koch, 2007).

Otras investigaciones realizadas encontraron que inocular con *Azotobacter* sp las yemas de caña de azúcar al momento del trasplante, y la inmersión de las raíces al momento de la siembra, origina un incremento en la velocidad de germinación. También se observó una mejoría en el establecimiento del material trasplantado, en el desarrollo de las raíces, el macollamiento, la altura y número de tallos móviles. Todo lo anterior resultó en un incremento de la producción por unidad de área (Agüero, 2009).

4 MARCO TEORICO

4.1 Generalidades sobre el cultivo de caña de azúcar

Según (Rodríguez, 2001) la caña de azúcar actual está formada por varias especies (Tabla 1), en su mayoría *S.officinarum* y *S.spontaneum*, las cuales han aportado más del 95% de las últimas variedades.

Tabla 1. Composición de la caña de azúcar moderna (Rodríguez, 2001).

Género	Especie	Características fundamentales
<i>Saccharum</i>	<i>S. Officinarum</i>	Son las llamadas cañas nobles. Originalmente se utilizaron directamente como variedades comerciales. Sacarosa hasta 15%, fibra 10%. Más susceptibles a factores adversos.
	<i>S. spontaneum</i>	Cañas silvestres o salvajes. Mayor resistencia. Alto contenido de fibra (+30%) y bajo contenido azucarero (4-8%).
	<i>S. robustum</i>	También llamada caña de la India. Se usó hace cientos de años. Contenido azucarero bajo (<10%) y alto de fibra (20%).
	<i>S. sinense</i>	Caña de la China. Aceptable contenido de sacarosa (>12%) y fibra alrededor de 12%.

Morfológicamente, las raíces de caña de azúcar son de dos tipos; estaca original o primordiales y las permanentes, las primeras son delgadas, muy ramificadas y su periodo de vida llega hasta el momento en que aparecen las raíces en los nuevos brotes, lo cual ocurre entre los dos y tres meses de edad. Las segundas brotan de los anillos de crecimiento radical de los nuevos brotes. Son numerosas, gruesas, de rápido crecimiento y su proliferación avanza con el desarrollo de la planta. Cerca del 85% de las raíces predominan en los primeros 60 cm de profundidad y su distribución horizontal en el suelo alcanza hasta dos metros independiente de la edad, la variedad y el corte (Estévez *et al.*, 1995).

Otra parte importante en la caña es el tallo, en el cual se almacenan los azúcares, la caña de azúcar forma cepas constituidas por la aglomeración de tallos, que se originan de las yemas del material vegetativo de siembra y de las yemas de los nuevos brotes subterráneos. Los tallos están formados por nudos que se encuentran separados por entrenudos en los que se desarrollan las yemas y las hojas (Estévez *et al.*, 1995).

Finalmente en las hojas es donde ocurren las transformaciones del agua, el CO_2 y los nutrientes en carbohidratos, en presencia de luz solar; las funciones principales de la hoja son. La fotosíntesis y la traslocación de nutrientes. La respiración y la transpiración. Cada uno de estos procesos implica un intercambio de gases entre el interior y el exterior de la planta, que es controlado por los estomas (Estévez *et al.*, 1995).

4.1.1 Fisiología del cultivo

En cuanto a la fisiología, La Fn (Fotosíntesis neta) es más alta en plantas jóvenes a niveles de luz superiores a $500 \mu\text{mol/m}^2/\text{seg}$ (en el valle geográfico del río Cauca la luz al medio día sin nubes es de $2200 \mu\text{mol/m}^2/\text{seg}$ aprox). Investigaciones de CENICAÑA confirmaron que en la zona azucarera de Colombia la Fn máxima ocurre en plantas de tres meses de edad y luego decrece notoriamente (Figura 1 a y b) (Estévez *et al.*, 1995).

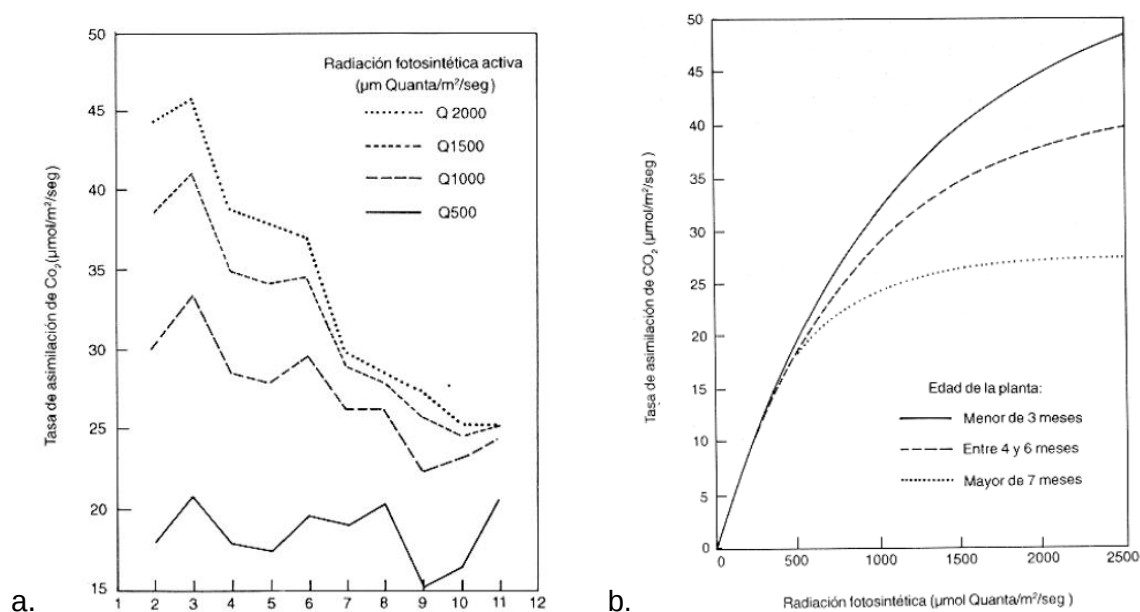


Figura 1. a. Fluctuación de la tasa de fotosíntesis con la edad del cultivo de caña de azúcar b. Relación entre la tasa de asimilación de CO_2 (Fotosíntesis) de la caña y la disponibilidad de luz a varias edades del cultivo.

Fuente: (Estévez *et al.*, 1995).

Hart & Burr (1967) y Alexander (1973) citados por (Estévez *et al.*, 1995), demostraron que las deficiencias de nitrógeno, potasio y fósforo resultaron en un menor valor de la Fn (Fotosíntesis neta). A pesar de la falta de información, parece

lógico pensar que la Fn disminuye con las deficiencias de cualquier nutriente que cause clorosis.

4.1.2 Distribución de suelos

De acuerdo con los estudios detallados de suelos, realizados en el 2008, en las 227.748 ha (Informe anual CENICAÑA, 2012) hectáreas áreas de influencia de los 13 ingenios azucareros ubicados en el valle geográfico del río Cauca, solo en el 10% del área ocurre heterogeneidad textural a través de los horizontes del perfil, en el 90% restante existe homogeneidad textural y predominio de la familias texturales muy fina, fina, franca fina y franca gruesa. Así mismo, el 47.8% del área es ocupada por suelos del orden Mollisol; el 31% por Vertisoles; el 17.3% por Inceptisoles, el 2,3 % por Alfisoles; el 0,8% por Entisoles, el 0,5% por Ultisoles y menos del 0,01% por Histosoles (Quintero *et al.*, 2008).

4.1.3 Fertilización

El suministro de nutrientes depende de la capacidad del suelo para suministrar el nutriente (capacidad de intercambio catiónico) y de la eficiencia de la planta para absorber el nutriente disponible. Así, para el nitrógeno, el suministro depende de factores de suelo y clima que afectan la mineralización de la materia orgánica del suelo y de los residuos de cosecha del ciclo anterior, para el fósforo y el potasio el suministro depende de factores como la capacidad de fijación, y de manejo, en relación con fertilizaciones previas y su acumulación en los reservorios lábiles y no lábiles (Palma *et al.*, 2002).

El cultivo de caña de azúcar (*Saccharum officinarum*) requiere de 1.2 kg de N, 0.7 kg de P y 3.0 kg de K, por tonelada de caña, por lo cual es considerado un cultivo extractivo, con estas necesidades nutricionales la dosis de fertilización recomendada es 120 Kg N, 60 Kg P y 60 kg de K por hectárea; sin embargo, esta dosis es insuficiente para satisfacer los requerimientos; además, se ha detectado que sólo 30% del N del fertilizante es utilizado por el cultivo de la caña de azúcar (Arreola *et al.*, 2004).

La urea ($\text{CO}(\text{NH}_2)_2$) es la fuente nitrogenada que se emplea con mayor frecuencia en el cultivo de la caña. Posee cerca del 46% de N y es por lo general una de las más baratas por unidad de este elemento. La urea debe hidrolizarse primero como amonio y luego nitrificarse mediante bacterias aeróbicas. Se ha investigado que esta fuente de nitrógeno tiene una solubilidad relativamente alta y su efecto

residual puede desaparecer en unos dos o tres meses, después de la aplicación, además, la mayor parte del nitrógeno aplicado es absorbido por las plantas en las primeras cinco semanas posteriores a su aplicación (Gómez & Sánchez, 1968).

El sulfato de amonio ($(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$) es muy soluble en agua pero poco higroscópico y no debe emplearse en suelos ácidos; es un fertilizante en forma de cristales blancos que posee 21% de N y 23.7% de S.

El nitrato de amonio ($\text{NH}_4 \text{NO}_3$) también fue usado como fuente nitrogenada, pero es muy higroscópica, soluble y altamente explosiva. Se caracteriza por poseer 33.5% de N, en dos formas: nítrica (16.75%) y amoniacal (16.5%). Es la fuente con más rápida acción sin embargo, bajo condiciones de alta precipitación se lixivia de manera considerable (Aguero, 2009).

Debido a que las socas (rebrote de los tallos de caña sembrados) se cosechan a 12 meses, la fertilización debe realizarse tres meses después del rebrote (máximo ahijamiento), para que la planta disponga de seis o siete meses para absorber este fertilizante; un exceso de N disponible en la época de cosecha es la principal causa del bajo contenido de sacarosa y alto contenido de azúcares reductores, glucosa y fructosa (García *et al.*, 2003). El N aplicado en un período de 3 meses después del corte, ocasiona incrementos en el contenido de sacarosa sin causar ningún efecto negativo en la calidad de los jugos (Gómez & Sánchez, 1968).

Los últimos estudios sugieren que el nitrógeno se acumula principalmente en las hojas durante una buena parte del ciclo pero al final es transportado mayoritariamente hacia los tallos; además se han detectado dos periodos críticos de absorción (Figura 2), el primero de los cuales abarca las etapas de macollamiento y crecimiento en la fase vegetativa (93- 123 días después del corte ddc) y el segundo en la etapa de maduración de la fase reproductiva (185 -214 ddc) (Rengel *et al.*, 2011).

También se ha detectado que durante los cuatro primeros meses del ciclo el cultivo había producido solamente el 16.5% de su biomasa seca, pero había acumulado entre 20 y 40% de los macronutrientes, lo cual sugiere la necesidad de su suministro desde las primeras etapas de cultivo (Rengel *et al.*, 2011) (Figura 2).

El N influye en el desarrollo de las cepas de la caña principalmente por sus efectos en el macollamiento y en el vigor de los tallos (Quintero, 1997). Altas aplicaciones de N pueden aumentar el índice de área foliar, la tasa de crecimiento y el

rendimiento de tallos, aunque en detrimento de la calidad del jugo (Wiedenfeld, 1997).

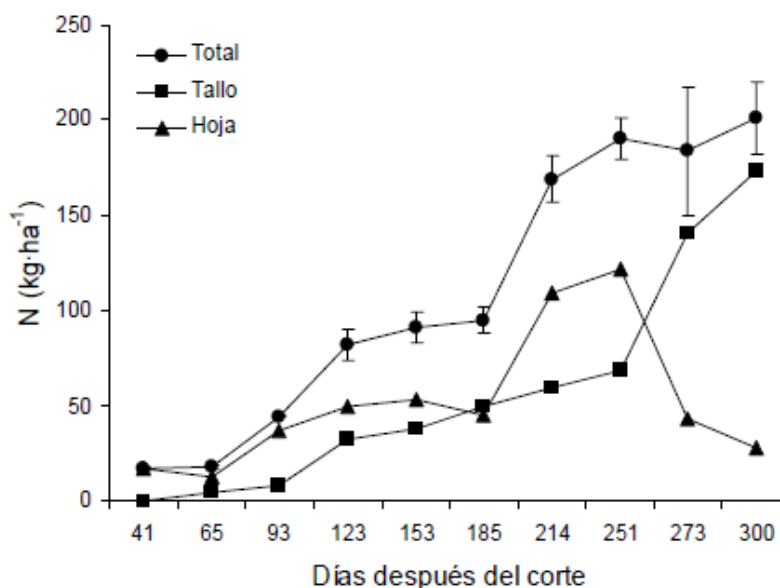


Figura 2. Acumulación de N en tallos y hojas de caña de azúcar var. RB 85-5035. Las barras verticales del total indican el error estándar (no visibles cuando son menores que el marcador)
Fuente: (Rengel *et al.*, 2011).

4.2 El ambiente rizosferico

El termino rizósfera se refiere a la zona del suelo influenciada por el desarrollo de raíces, en donde se activa la proliferación de microorganismos, gracias al suministro de exudados radicales que contienen azúcares, aminoácidos, vitaminas y enzimas, además de señales que modulan la interacción microorganismo – planta (Avella, 2007). Las raíces de las plantas leguminosas secretan varias sustancias orgánicas que estimulan el desarrollo de una microflora en la rizósfera. Este estímulo no está restringido a los rizobios, sino que abarca muchas bacterias diferentes de la rizósfera (Salazar, 2003).

Los microorganismos rizosfericos pueden clasificarse en: asociativas o de vida libre, aerobias, anaerobias o aerobias facultativa. Las principales especies bacterianas asociadas con gramíneas son *Azospirillum lipoferum*, *A. brasilense* y *A. amazonense* (Döbereiner *et al.*, 1995.) *Herbaspirillum seropedicae* y *Acetobacter diazotrophicus*; *Enterobacter agglomeran*, *E. cloacae*, *Bacillus azotofixans*, *B. polymyxa* y *Alcaligenes faecalis*, *Klebsiella* sp. y bacterias de los géneros *Azotobacter* y *Pseudomonas* (Loredo *et al.*, 2004) , en la Tabla 2 se

presentan algunas cepas aisladas de caña de azúcar (Rodríguez, 2001, Rodríguez C. *et al.*, 2005).

Tabla 2. Cepas aisladas de caña de azúcar en diferentes estudios(Rodríguez C. *et al.*, 2005).

Cepas	Procedencia
<i>Gluconacetobacter diazotrophicus</i> cepa PAI-5 (ATCC 49037) (cepa de referencia)	Aislada a partir de raíces de caña de azúcar en Brasil (Cavalcante y Dobereiner, 1998)
<i>Gluconacetobacter diazotrophicus</i> cepa 1-05	Aislada de tallos de la variedad de caña de azúcar Jaronú 60-5 (Heydrich y cols., 1998)
<i>Gluconacetobacter diazotrophicus</i> cepa 4-02	Aislada de tallos de la variedad de caña de azúcar Media Luna 318 (Heydrich y cols., 1998)
<i>Bacillus licheniformis</i> cepa 5	Aislada de tallos de la variedad de caña de azúcar Cuba 323-68 (Rojas y Cols.,2001)
<i>Enterobacter agglomerans</i> cepa 2	Aislada de tallos de la variedad de caña de azúcar Media Luna 318 (Rojas y cols., 2001)
Aislados 10,13,14,100,102,104,105,109,12,19,101, 103,106,107,17, 18,15,16.	Provenientes de tallos de la variedad de caña de azúcar Cuba 1051-73, aisladas según metodología de Cavalcante y Dobereiner, 1988.
Aislados 23,26,202,27,21,25,201,203,206,207,20,22,28,29, 204,205,208,24.	Provenientes de tallos de la variedad de caña de azúcar Cuba 323,68. aisladas según metodología de Cavalcante y Dobereiner, 1988.
Aislados 39,305,33,34,35,38,302,304,31,32,36,37,303,30.	Provenientes de tallos de la variedad de caña de azúcar Cuba 86-12. aisladas según metodología de Cavalcante y Dobereiner, 1988.

La capacidad de algunos integrantes de la microbiota nativa de la caña de azúcar de producir fitohormonas, como las bacterias promotoras de crecimiento (PGRs) y realizar la fijación biológica del nitrógeno, como las bacterias fijadoras de nitrógeno o diazotróficas, constituye un criterio de selección importante de especies que en su relación con la planta contribuyen a su desarrollo y productividad (Rodríguez C. *et al.*, 2005).

4.2.1 Bacterias promotoras de crecimiento (PGRs).

Las bacterias promotoras de crecimiento vegetal tienen la capacidad de biosintetizar sustancias promotoras de crecimiento, como las auxinas, esta habilidad

se manifiesta en medios suplementados con L-triptófano, el principal precursor de la biosíntesis de Acido Indol Acético (AIA) (Brandl *et al.*, 1996, Rodríguez C. *et al.*, 2005).

La promoción de crecimiento radical es uno de los principales factores por los cuales se evalúa el efecto benéfico de las distintas PGPR. En este sentido, la producción bacteriana de AIA y la alta sensibilidad de las raíces a dicha hormona sería fundamental en la respuesta a la inoculación. Bacterias que secretan bajos niveles de AIA (10^{-9} a 10^{-12} µg) estimularían la elongación de raíces, mientras que bacterias altamente productoras de auxinas promoverían la formación de raíces laterales o el desarrollo de pelos absorbentes (Schoebitz, 2006)

Según (Rodríguez C. *et al.*, 2005) los microorganismos en los que se detecto producción de AIA también mostraron actividad nitrogenasa. Estos resultados apoyan la hipótesis propuesta por (Bashan & Levanony, 1990), en la que sostienen que existen varios mecanismos involucrados en la asociación planta-microorganismo, que actúan simultáneamente, y cuya suma, bajo condiciones ambientales favorables, deviene en los cambios observados en el crecimiento de las plantas.

Finalmente dentro de las metodologías más usadas para medir la producción de AIA, según (Bautista & Gallardo, 2008, Schoebitz, 2006, Rodríguez *et al.*, 2005), está el método de Salkowski, el cual es eficaz y sencillo para la detección y cuantificación de AIA.

4.2.2 Bacterias fijadoras de nitrógeno o diazotroficas - Fijación Biológica de Nitrógeno(FBN).

La utilización del gas nitrógeno (N_2) como fuente de nitrógeno se denomina fijación de nitrógeno y es una propiedad que poseen sólo algunos microorganismos. La fijación biológica del N_2 es efectuada por las bacterias de vida libre o algas verde-azules que hacen uso del N_2 por medios no simbióticos o por asociaciones simbióticas compuestas por un microorganismo y una planta superior, tales como la simbiosis rhizobium-leguminosa, importante desde el punto de vista agrícola (Salazar, 2003); también existen evidencias de una relación evolutiva entre bacterias y las plantas hospederas, las cuales establecen una interacción menos específica que la simbiosis de leguminosas (Bashan & Levanony, 1990).

El proceso de fijación biológica de nitrógeno requiere de un aporte considerable de ATP que exige un consumo significativo de oxígeno (O_2) durante la respiración

celular y es llevado a cabo por la acción del complejo enzimático nitrogenasa (Soto-Urzuza & Baca, 2001). Esta enzima está formada por dos proteínas, una que contiene hierro (proteína-Fe) y otra que contiene molibdeno y hierro (proteína Mo-Fe). La nitrogenasa que contiene Mo es la más ampliamente distribuida (Aguero, 2009). Este complejo enzimático nitrogenasa, responsable del proceso, es inactivado por el O_2 por lo que las bacterias diazotróficas han desarrollado una serie de estrategias dependiendo de su estilo de vida para resolver esta aparente paradoja y proteger a la nitrogenasa de su inactivación irreversible, entre los cuales esta:

- Evasión del O_2 y desarrollo de ambientes anaeróbios,
- Generación de barreras físicas que impidan la difusión O_2 hacia el complejo enzimático nitrogenasa.
- Eliminación metabólica del O_2 que permite reducir su concentración a niveles aceptables cerca del complejo enzimático nitrogenasa.
- Modificación conformacional del complejo enzimático de un estado protegido inactivo a uno activo.
- Síntesis *de novo* del complejo enzimático nitrogenasa alterando el equilibrio entre la síntesis y degradación (Soto-Urzuza & Baca, 2001) (Lee *et al.*, 2004).

Así, dependiendo de las condiciones de crecimiento, en *Azotobacter* sp funcionan al menos cuatro de los anteriores mecanismos para proteger el complejo enzimático nitrogenasa (Soto-Urzuza & Baca, 2001).

4.3 Generalidades sobre *Azotobacter* spp

Fue descrito por primera vez por Beijerinck (1901) y en la actualidad incluye seis especies: *A. chroococcum*, *A. vinelandii*, *A. beijerinckii*, *A. nigricans*, *A. armeniacus* y *A. paspali*.

REINO: Bacteria

PHYLUM: Proteobacteria

CLASE: Gamma proteobacteria

ORDEN: Pseudomonadales

FAMILIA: Azotobacteraceae

GÉNERO: *Azotobacter*

Las bacterias del género *Azotobacter* tienen un diámetro celular de 1.5 a 2.0 μm por 3.0 - 7.0 μm de longitud, son pleomórficas, variando su morfología desde bacilos hasta células en forma de cocos. Se les observa como células individuales, como pares o formando agregados irregulares, y algunas veces formando cadenas de tamaño variable. Se reproducen por fisión binaria y se mueven por flagelos peritricos (Echeverría & Koch, 2007).

Son bacterias aerobias de vida libre pero pueden crecer a bajas concentraciones de oxígeno. Fijan nitrógeno hasta en condiciones microaerobias (2% oxígeno). La fijación de nitrógeno depende de la presencia de Molibdeno, Vanadio o enzimas nitrogenasas que contengan Fe. Pueden utilizar alcoholes, azúcares o sales de ácidos orgánicos como fuentes de carbono (Gallegos & Quispe, 2009).

Morfológicamente, las colonias son viscosas, convexas, lisas o arrugadas y poseen pequeñas inclusiones granulares, el color se presenta en diferentes matices de pardo, producen pigmentos que en ocasiones se difunden en el medio de cultivo (Agar-Asbhy) selectivo para este género, pueden llegar a medir de 2 – 6 mm de diámetro en 5 días a una temperatura de 28 a 30° C (Figura 3) (Avella, 2007, Parra, 2000) son bacilos gram negativos grandes y cortos que crecen en un pH mínimo de 4,8 – 6,0 y a un máximo de 8,5, con un pH ideal de 7,0-7,5 (Gallegos & Quispe, 2009).

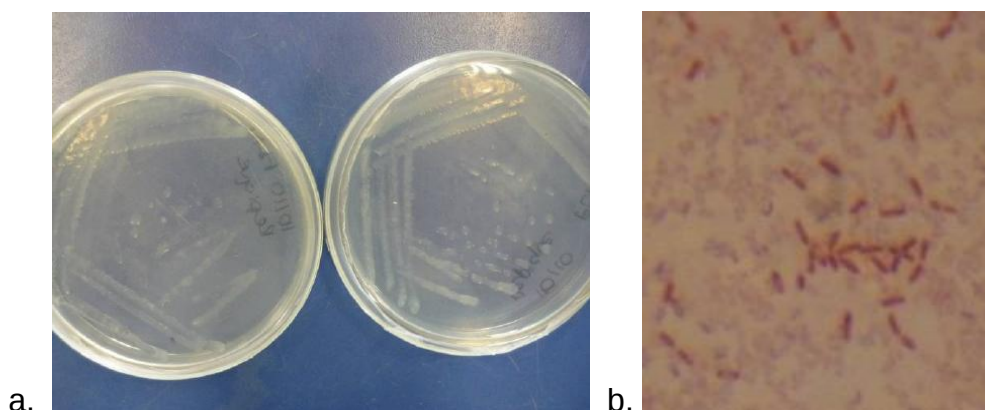


Figura 3. a. Aislamiento de *Azotobacter* spp en medio semi-sólido b. microscopio 1000x (Aguero M., 2009).

Para el caso de los aislamientos del género *Azotobacter* las pruebas bioquímicas usuales son prueba de catalasa, oxidasa, utilización de azúcares, producción de

pigmentos, formación de quistes y motilidad (Brenner *et al.*, 2005, Avella, 2007, Borda M. *et al.*, 2009) (Tabla 3).

Tabla 3. Movilidad, formación de filamentos y pruebas bioquímicas utilizadas para la caracterización del género *Azotobacter* spp (Avella, 2007).

Características y Test/Especie	A. <i>vinelandii</i>	A. <i>beijerinckii</i>	A. <i>paspali</i>	A. <i>armeniacus</i>	A. <i>nigricans</i>	A. <i>chroococcum</i>
Movilidad	+	-	+	+	-	-
Filamentos en cultivos jóvenes	- b	- b	+	- b	- b	- b
Oxidasa	+	D	-	D	D	D
Peroxidasa	+	+	+	D	+	+
Nitrato-Nitrito	+	+	+	-	+	+
Meso-inositol	+	D	-	D	-	-
Fructosa	+	+	+	+	+	+
Glucosa	+	+	+	+	+	+
Sucrosa	+	+	+	+	+	+
Malonato	+	+	-	-	D	D
Benzoato	D	+	-	-	-	+
Caproato	+	-	-	-	-	+
Caprilato	+	-	-	+	-	-
Maltosa	+	D	-	+	D	+
Rafinosa	D	D	-	D	D	+
Glicerol	+	D	-	-	-	D
Sorbitol	+	D	-	+	D	+
Manitol	+	D	-	+	D	+
Ramnosa	+	-	-	-	-	-

- b: Estas especies podrían producir esporádicamente filamentos de diferente longitud

D: 11% - 89% de las cepas son positivas

+: 90% o más de las cepas son positivas

-: 90% o más de las cepas son negativas

Finalmente; en caña de azúcar se ha reportado que para hacer aislamientos, lo conveniente es realizar los muestreos después de los cinco meses, donde hay suficiente humedad y el cultivo se encuentra en activo crecimiento, condiciones para un óptimo desarrollo de los microorganismos en la rizósfera (Cracogna *et al.*, 2003).

4.3.1 Medios de cultivo para bacterias diazotróficas como *Azotobacter* sp

Según (Rodríguez C. *et al.*, 2005) las fuentes carbonadas guarapo, sacarosa y fructosa, presentes en el medio de cultivo, estimulan la actividad nitrogenasa de los diazótrofos representativos del grupo; la actividad nitrogenasa fue mayor en ausencia de nitrógeno, así como con la adición de KNO_3 . Además la actividad nitrogenasa de las cepas endófitas en estudio se favorece cuando estas se cultivan a pH ácido a neutro, entre 5 y 7, y se inhibe a pH 3 y 8 (Bashan & Levanony, 1990).

Lo anterior lo confirman (Korndofer *et al.*, 2004), quienes explican que el aumento de la actividad microbiana se debe al contenido de fuentes orgánicas provenientes de la vinaza que proporcionan energía para los microorganismos, y a su vez aumenta el crecimiento acelerado de la masa microbiana, a lo que (Garzón *et al.*, 2001) encontraron crecimiento de *Azotobacter* sp usando como caldo de cultivo 15 g/l de carbonato, 5 g/l de sacarosa, 0.1 g/l fosfato dipotásico, 5 g/l de sulfato de calcio y 1 litro de vinaza con unos exponenciales de 10^9 UFC/ml. Finalmente (CORPOICA, 2007), encontraron que a concentraciones de vinaza de 20 % v/v *Azotobacter chroococcum* y *Azotobacter vinelandii* crecieron a un 57×10^8 y 14×10^8 respectivamente.

4.4 Métodos moleculares para identificar presencia de genes fijadores de nitrógeno.

Los genes *nif* y el DNAr 16S han sido reportados para la caracterización de diferentes géneros de bacterias diazotróficas, ya que son muy conservados y se encuentran en todos microorganismos fijadores de nitrógeno (Avella, 2007).

La producción y regulación de la enzima nitrogenasa es codificada por los genes *nif*, de estos, el gen *nif* H codifica la dinitrogenasa en las bacterias fijadoras de nitrógeno. La diversidad de las bacterias diazotróficas asociadas a plantas es directamente detectada usando fragmentos del gen *nif* H sin necesidad de usar metodologías tradicionales de cultivo. (Thaweenut *et al.*, 2011) encontraron especies de *Azoarcus* sp usando secuencias de nucleótidos del gen *nif* H, usando el método de reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

5 OBJETIVOS

5.1 OBJETIVO GENERAL

Evaluar el potencial de cepas nativas de *Azotobacter* spp como agente reductor de urea en la fertilización del cultivo de caña de azúcar (*Saccharum* spp) hasta la fase macollamiento.

5.2 OBJETIVOS ESPECIFICOS

- Identificar cepas nativas de *Azotobacter* spp de un suelo Udic Haplustolls serie SINAÍ (SK) cultivado con caña de azúcar.
- Establecer las mejores cepas mediante la evaluación de síntesis de compuestos indólicos - producción de Acido Indol Acético (AIA) y fijación de nitrógeno.
- Determinar experimentalmente el efecto promotor de crecimiento de las cepas y su relación con la dosis de urea en plantas de caña de azúcar hasta la fase de macollamiento.

6 METODOLOGÍA

6.1 Aislamiento e identificación de cepas nativas

6.1.1 Localización

La investigación se llevo a cabo en el Departamento de Cauca, municipio de Miranda, se muestreo un cultivo de caña de azúcar, ubicado en las coordenadas W 76° 20' 37" N 3 15' 16"; a una altura de 1200 m.s.n.m., con una temperatura media de 24°C., 81% de humedad relativa y una precipitación de 1300 mm/año (Figura 4).

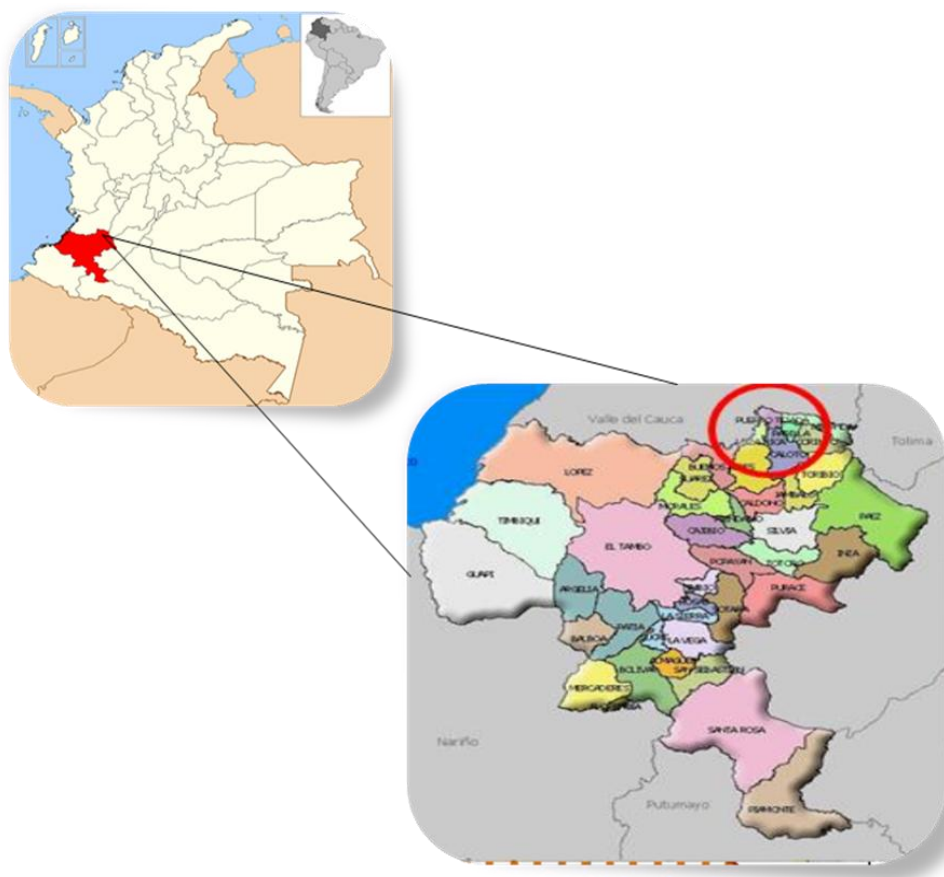


Figura 4. Esquema ubicación espacial.

El orden de suelo corresponde a un Molisol (Quintero *et al.*, 2008) (Tabla 4), el cual según Revelo *et al.*, 1994, Quintero *et al.*, 2008 representan el 47.8 % del área cultivada con caña de azúcar, La variedad de caña seleccionada es la CC 85-

92 por ser la más abundante en la región con un 66.4% (Palma *et al.*, 2010) (Informe anual CENICAÑA, 2012).

Tabla 4. Análisis fisicoquímico del suelo del cultivo; Laboratorio fisicoquímico de suelos Ingenio Providencia S.A

Prof cm	pH V:V 1:1	CE dS/m	MO W.B %	P Bray II Ppm	P Fijación %	S ppm	Cationes Intercambiables					CIC	Ca/Mg	PSI	PMgl
							Meq/100g								
							Ca	Mg	K	Na	Al				
0-30	5,2	0,19	1,60	23,62	0,35	23,62	5,34	2,27	0,16	0,18	0,22	12,22	2,35	1,47	18,58
Saturación de bases (%)						Micronutrientes ppm					Textura Bouyoucos %			Clasif Text.	
Ca	Mg	K	Na	Al	B	Cu	Fe	Mn	Zn	Arena	Limos	Arcillas			
65,36	27,78	1,96	2,20	1,56	0,400	4,87	61,00	6,43	1,68	27,12	38,00	34,88	FAr		

Fuente: Ingenio Providencia S.A IPSA.

6.1.2 Muestreo

El muestreo se realizó en forma de sistematizada a lo largo del cultivo (Torres R. *et al.*, 2000), dejando una distancia de seis surcos entre el inicio de la parcela y el primer surco de muestreo; y así sucesivamente entre cada uno de estos hasta completar un total de cinco surcos de muestreo a lo largo de la parcela. A lo ancho de la parcela en cada uno de los surcos de muestreo se tomaron tres puntos, dos de estos a una distancia aproximada de siete metros de cada borde de la parcela y un punto central; para un total de 15 muestras (Figura 5) (CENICAÑA, 2009).

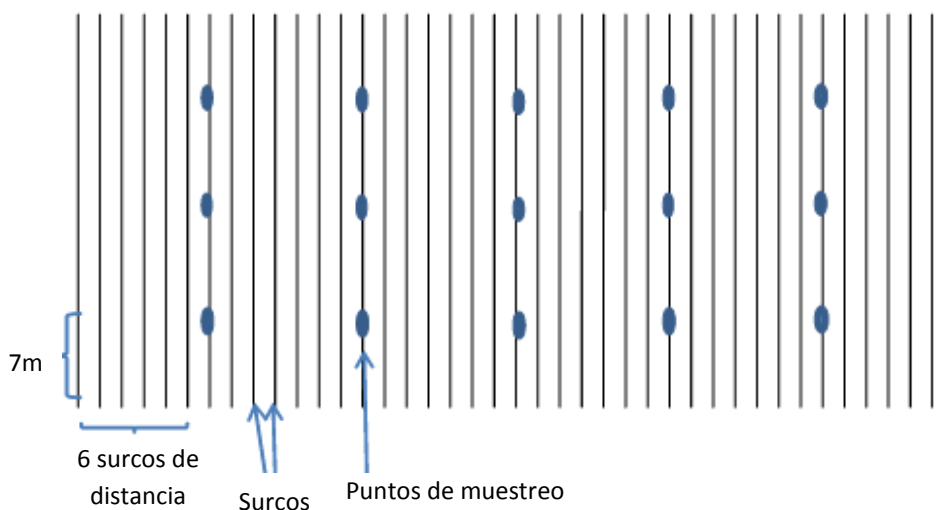


Figura 5. Esquema muestreo de suelos (CENICAÑA 2009).

La parcela seleccionada tuvo un área de dos hectáreas, sembradas con la variedad CC 85-92 y una edad de siembra de ocho meses. En cada punto se extrajo la plántula completa (Figura 6), con el fin de obtener muestras de hoja, tallo y suelo rizosférico, estas muestras fueron tomadas con un barreno de media caña, previamente desinfectado con una solución de yodo al 2%, y a una profundidad entre 20-25 cm, para coleccionar la mayoría aerobias asociadas a las raíces primarias encargadas de absorber los nutrientes en la caña de azúcar (Estévez *et al.*, 1995) (Borda M. *et al.*, 2009). Las muestras fueron colocadas en bolsas plásticas previamente esterilizadas y transportadas al laboratorio manteniendo una temperatura de -9 °C.

Las muestras en el laboratorio fueron cortadas y separadas en raíz, tallo, y hojas, posteriormente fueron lavadas con agua destilada y Tween 80® en una concentración 0,1M; con el fin de eliminar excesos de suelo y contaminantes de las muestras (Gaviria, 2011).

Seguidamente se maceraron las hojas, tallo y suelo rizosférico por separado, en una solución compuesta por fosfato monopotásico (KH_2PO_4), fosfato dipotásico (K_2HPO_4) y cloruro de sodio (NaCl) a un pH de 6,8 ; con el fin de proporcionar las condiciones para el establecimiento de las bacterias (Aquilanti *et al.*, 2004). Se incubo a 28°C, permitiendo la recuperación de las concentraciones bacterianas presentes en las muestras tratadas. (Avella, 2007).



Figura 6. Obtención de bacterias presuntivas de *Azotobacter* sp.

6.1.3 Aislamiento primario

Para el aislamiento preliminar se uso la técnica de diluciones seriadas (Cárdenas *et al.*, 2010), que consiste en tomar 1ml del macerado en la solución de fosfatos e inocularlo en 9 ml de agua peptona estéril, para obtener la dilución 10^{-1} , y de esta manera secuencialmente hasta conseguir la dilución 10^{-6} .

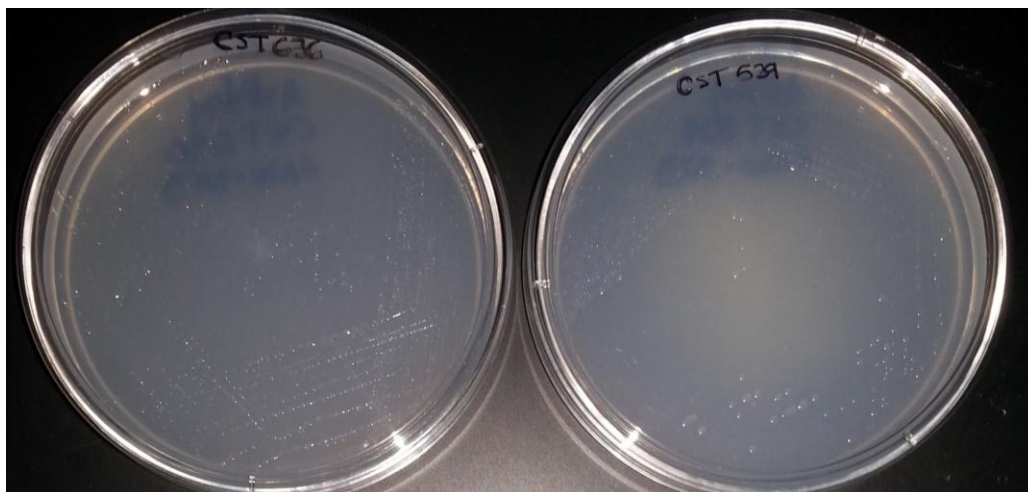
A partir de las diluciones 10^{-4} , 10^{-5} y 10^{-6} se realizaron siembras en cajas de agar Ashby- manitol (Anexo 1) por duplicado, las cuales fueron llevadas a incubación por 28°C por 18 días; hasta observar colonias mucilaginosas (Avella, 2007) (Borda M. *et al.*, 2009).

6.1.4 Aislamiento secundario

A partir de las colonias obtenidas se realizaron siembras por agotamiento en agar Ashby- manitol y se incubaron a 28°C por quince (15) días (Borda *et al.*, 2009). Estas colonias adquirieron una coloración de pardo a oscuro; posteriormente se realizaron observaciones morfológicas y tinción de gran (CORPOICA, 2007).

6.1.5 Macroscopía y microscopia

Los aislados fueron repicados nuevamente e incubados en Agar Ashby- manitol para obtener cultivos jóvenes, posteriormente se realizó una caracterización macroscópica (borde, consistencia, pigmentación, superficie, entre otras) y características microscópicas de las colonias (morfolología celular) en un microscopio Olympus CX21 (Figura 7), observándose bacterias de forma bacilar, ovoides de gran tamaño, entre 1-2µm, Gram negativas y en algunos casos se determino formación de quistes de resistencia para confirmar la morfolología típica de este género (Rodríguez *et al.*, 2005).



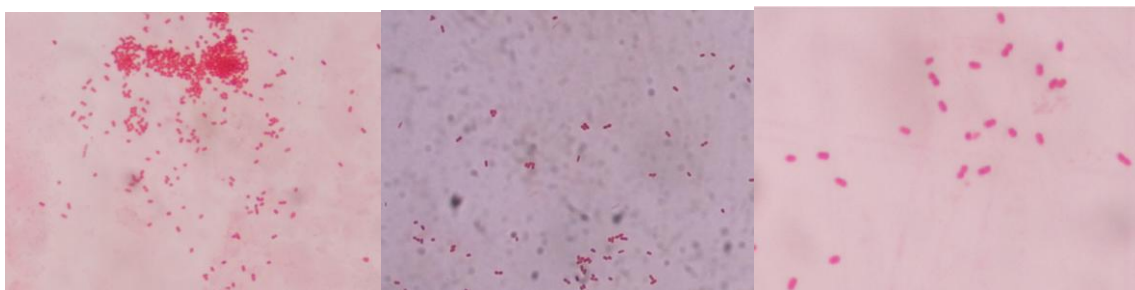


Figura 7. Macroscopía y Microscopia de los aislados.

6.1.6 Conservación de los aislamientos

Las muestras presuntivas de *Azotobacter* sp se conservaron con glicerol en una concentración final de 50% (v/v) a -70°C (Borda *et al.*, 2009). Esta técnica consistió en que a partir de las cepas aisladas se realizara cultivos en erlenmeyer de 100ml con 50ml de caldo nutritivo Merck® (Anexo 2), el cual se incubo a 28°C y 150 rpm. El cultivo fue puesto en tubos Ependorf de 1.5 ml con 50% (v/v) de glicerol puro y estéril y almacenados a -70°C.

6.1.7 Pruebas bioquímicas

Se sembraron los aislados por estría en cajas con agar Ashby- benzoato para evaluar la estabilidad de pigmentación luego de tres pases sucesivos (Anexo 1); esta técnica consiste en reemplazar la fuente de carbono para observar los cambios de coloración. Se incubo por 7 días a 28°C (Avella, 2007) (Borda *et al.*, 2009).

Para la identificación bioquímica se utilizó el test rápido BBL CRYSTAL ENTEROBACTER® (Figura 8), donde se evaluó la reducción de los siguientes azúcares: arabinosa, manosa, sacarosa, melibiosa, maltosa, sorbitol, manitol, adonitol, galactosa. Además se usó una batería de azúcares al 1% (p/v) para glucosa y benzoato en caldo base rojo de fenol (Anexo 3) (Tejera *et al.*, 2005). Acompañado de las pruebas de oxidasa y catalasa (Anexo 4). Todas las muestras se incubaron por un periodo de 18-24 horas a una temperatura de 28°C para su posterior lectura (Echeverría & Koch, 2007).

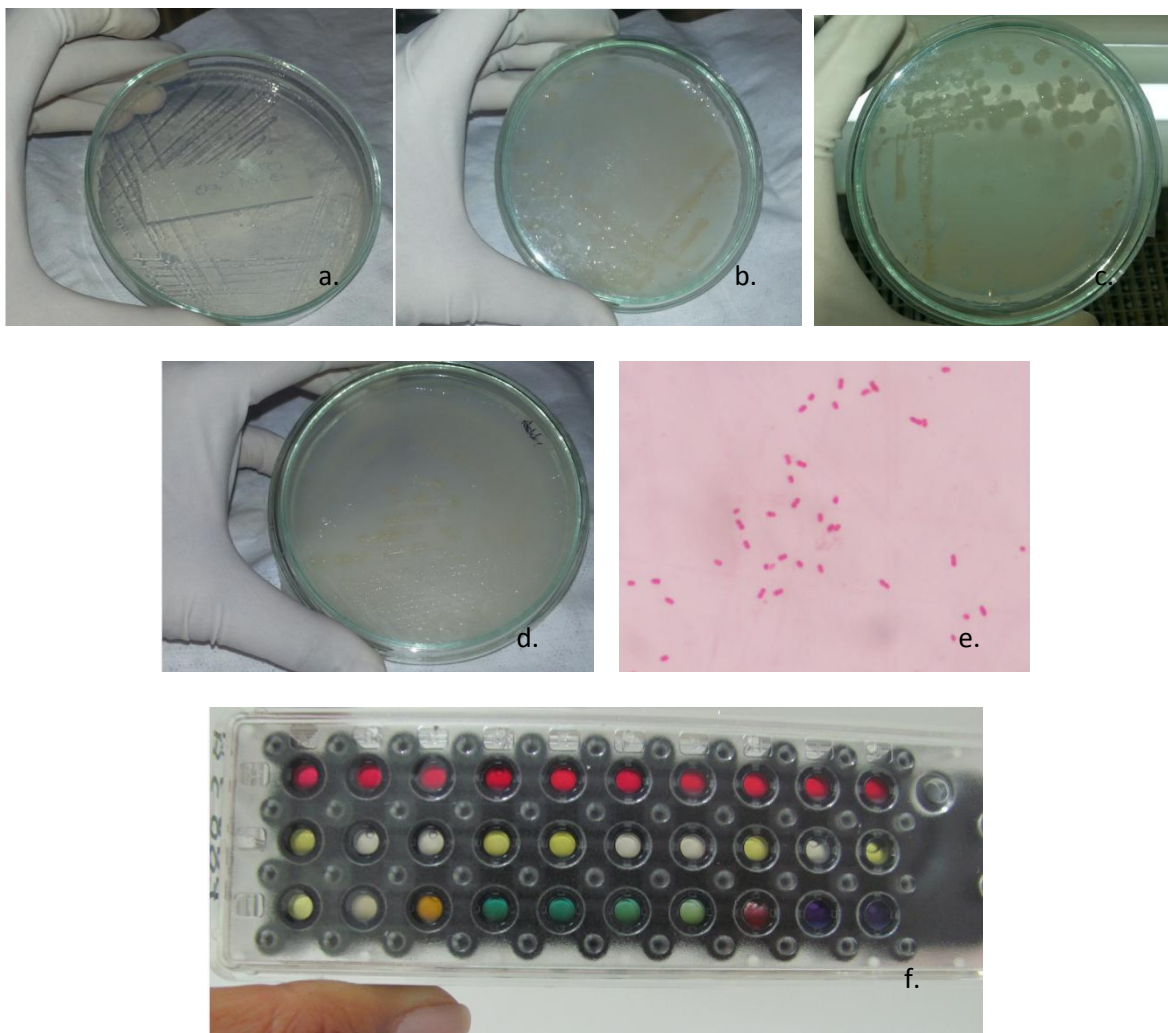


Figura 8. Aislados en medio Ashby a. Presuntiva *Azotobacter* sp cinco días de siembra b. aislado con 15 días de siembra c. observación de halos de solubilización de calcio d. oscurecimiento de aislados e. observación de los aislados, bacilos Gram – cortos f. Kit de pruebas bioquímicas.

6.2 Selección de las cepas de *Azotobacter* spp eficientes

Para seleccionar las mejores cepas o las más eficientes *in vitro* se tuvieron en cuenta los siguientes criterios: velocidad de crecimiento y crecimiento en vinaza, síntesis de compuestos indólicos (AIA), actividad de reducción de acetileno (ARA).

Además; se usó como control positivo la cepa de *Azotobacter vinelandii* (NCIM (8660). Debido a que por su capacidad metabólica y genética ha sido y es objeto de estudio en biofertilización y biotecnología como modelo; ya que incluye la

fijación de nitrógeno en presencia de oxígeno por tres sistemas diferentes de nitrogenasa; además posee mecanismos de protección de esta nitrogenasa; alta capacidad respiratoria que bajo ciertas condiciones es hasta 10 veces más alta que la de *E.coli*; también tiene la capacidad de formación de estructuras de resistencia (quistes) y la producción de polímeros de uso industrial (alginato y polihidroxibutirato) (Soto-Urzuza & Baca, 2001, Avella, 2007).

6.2.1 Velocidad de crecimiento

Se evaluó la cinética de crecimiento a las bacterias partiendo de un inoculo joven de 24 horas con una concentración celular de 3×10^8 cel/ml en fiolas con 200ml de Caldo Tripticasa de Soya (TSB) (Anexo 5), a una temperatura de 28°C y 120 rpm (Aquilanti *et al.*, 2004). El crecimiento se monitoreo por turbidimetría registrando absorbancia a 540 nm en un espectrofotómetro Genesys 20, cada tres horas durante 21 horas (Borda *et al.*, 2009).

De manera simultánea se efectuaron recuentos en cada tres horas, para esto se tomo una muestra de 1 ml de cada cultivo y se realizaron diluciones seriadas, sembrando a partir de las diluciones 10^{-4} , 10^{-5} y 10^{-6} Agar Tripticasa de Soya (TSA) por duplicado, registrando los recuentos y posteriormente se analizaron los resultados (Cárdenas *et al.*, 2010) (Figura 9).

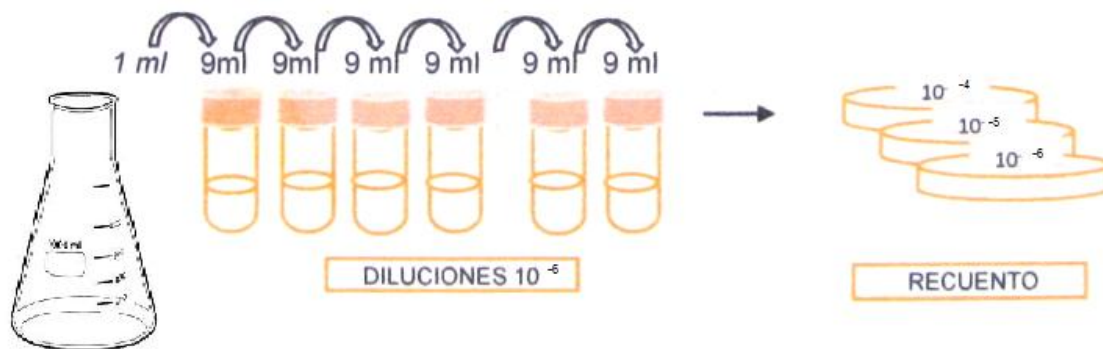


Figura 9. Metodología diluciones seriadas y recuento en placa

6.2.2 Crecimiento en vinaza

Esta prueba se realizó utilizando seis matraces con un volumen de 200 ml de una solución de vinaza al 20% (Figura 10); esta vinaza contenía sólidos insolubles de

12,2 g/l (Anexo 13), se esterilizaron bajo una temperatura de 120°C y 15 PSI de presión por un tiempo de 20 minutos para garantizar la eliminación de microorganismos.



Figura 10. Medio de cultivo con vinaza para el crecimiento de microorganismos.

Por otra parte se preparó una solución de cada microorganismo a evaluar (cinco cepas nativas y una cepa referencia); usando el patrón de turbidez (Madigan, *et al.*; 2007); número dos de McFarland; posteriormente se añadió 1ml de la suspensión en el volumen de 200ml de Vinaza 20%; para evaluar el crecimiento por conteo en placa según (CORPOICA, 2007, Garzón *et al.*, 2001) cada tres horas durante nueve horas (Agüero, 2009).

6.2.3 Síntesis de compuestos indólicos- producción de ácido indolacético (AIA)

Se realizó una curva patrón con reactivo de Salkowsky (Anexo 6) a base de ácido sulfúrico (H_2SO_4 300 mL, FeCl_3 2,25 g, y agua destilada 200 mL); para lo cual se preparó un patrón de diferentes concentraciones (0, 5, 10, 15, 20, 25, 30 y 35 $\mu\text{g/ml}$) de AIA comercial (sigma) y se sometió a reacción en una proporción de 2ml de reactivo Salkowski por 1 ml de las diferentes concentraciones patrón de AIA; posteriormente se realizó la lectura a una longitud de onda de 540 nm en un espectrofotómetro Génesis 20 (Bautista & Gallardo, 2008) (Cárdenas *et al.*, 2010). Con los datos se realizó una curva y la ecuación de la recta.

Se calculó la ecuación de la recta y el valor de R^2 (coeficiente de correlación), (Figura 11). A partir de la ecuación se calcularon las concentraciones de AIA en cada microorganismo evaluado.

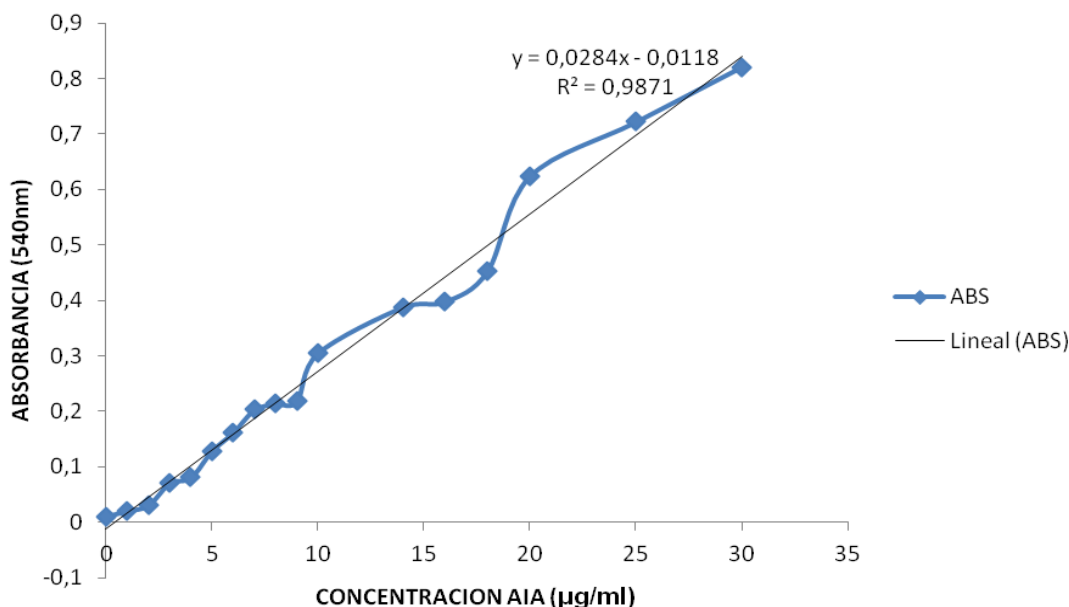


Figura 11. Curva de calibración producción de compuestos indólicos.

Para la evaluación de producción de promotores de crecimiento (fitohormonas) se tomaron las cinco cepas seleccionadas más la cepa control y se sembraron 20 ml de Caldo Triptófano (Anexo 7), igualándolo al patrón No. 2 McFarland en un erlenmeyer de 50mL. Realizando lecturas cada 8 horas hasta las 40 horas.

Para la lectura se tomaron 10 ml del caldo en tubos de polipropileno de 15ml y se centrifugo a 8000 rpm; en una centrifugadora 5810R Eppendorf 25°C durante 15 minutos, utilizando solo el sobrenadante. Luego se extrajo una alícuota de 1 ml del sobrenadante final y se colocó en tubos, posteriormente se adicionaron 2 ml de reactivo de Salkowsky, para luego colocarlos en oscuridad por 15 min, finalmente, se realizó la medición de cada muestra en el espectrofotómetro a una longitud de onda de 530nm, utilizando un cultivo sin inocular como blanco (Gallegos & Quispe, 2009, Bautista & Gallardo, 2008).

6.2.4 Actividad y reducción de acetileno (ARA).

Esta metodología se basa en el principio de que el complejo de la nitrogenasa propio de los organismos fijadores de nitrógeno es capaz de catalizar la reducción de nitrógeno a amoníaco con la consecuente liberación de hidrógeno; pero también el complejo es capaz de reducir otros sustratos como el acetileno, por lo que se convierte en una manera de cuantificar la capacidad de fijación de nitrógeno (Otero, 2011).

Por lo anterior las bacterias se inocularon en tubos de 30 ml de capacidad con 12 ml del medio Ashby sin agar, se incubaron con tapón de algodón durante 24 horas a 32°C, posteriormente se remplazó el 10% de la atmosfera del tubo de cultivo con acetileno y se sustituyó el tapón de algodón por uno de caucho sellado herméticamente (Orozco J. & Martínez, 2009). Se incubó 1 h a temperatura ambiente según la metodología descrita por (Obando *et al.*, 2010) (Otero, 2011). La concentración de etileno se midió inyectando 100 µl de la atmosfera del tubo de cultivo en un cromatógrafo de gases SRI 8610C (Tabla 5). Para calcular la actividad de reducción de acetileno se realizó una curva de calibración a partir de diluciones seriadas de etileno en concentraciones de 1:50, 1:30 y 1:10 µl (Figura 12).

Tabla 5. Volúmenes inyectados para curva de calibración de etileno.

Vol Inj (µL)	Mol C ₂ H ₄ Inj	Std Pk Ht
50	2.04E-09	470.6320
50	2.04E-09	471.9780
50	2.04E-09	460.5570
30	1.22E-09	285.1570
30	1.22E-09	289.6010
30	1.22E-09	295.1165
10	4.07E-10	104.3540
10	4.07E-10	95.8030
0	4.07E-10	98.1280

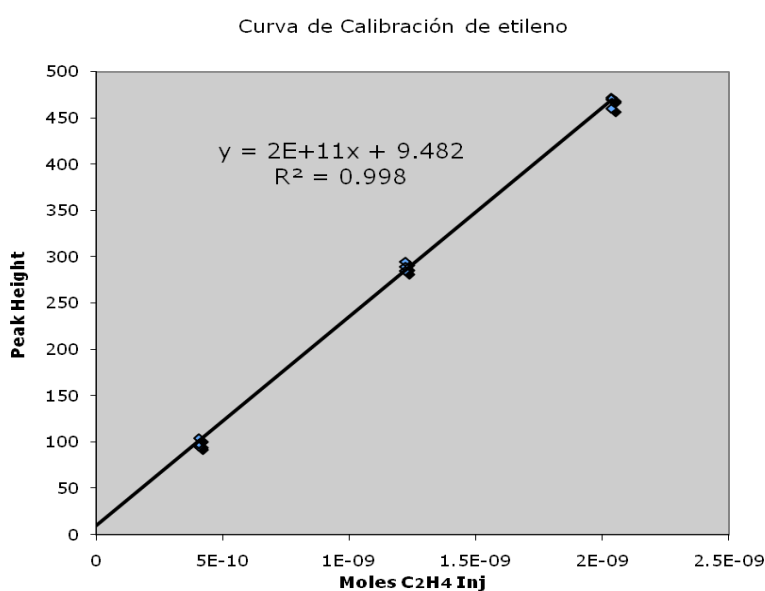


Figura 12. Curva de calibración de etileno por cromatografía de gases.

La actividad de reducción de acetileno para cada aislamiento, se calculó según la altura del pico de etileno en el cromatograma extrapolando en la curva patrón (Figura 13).

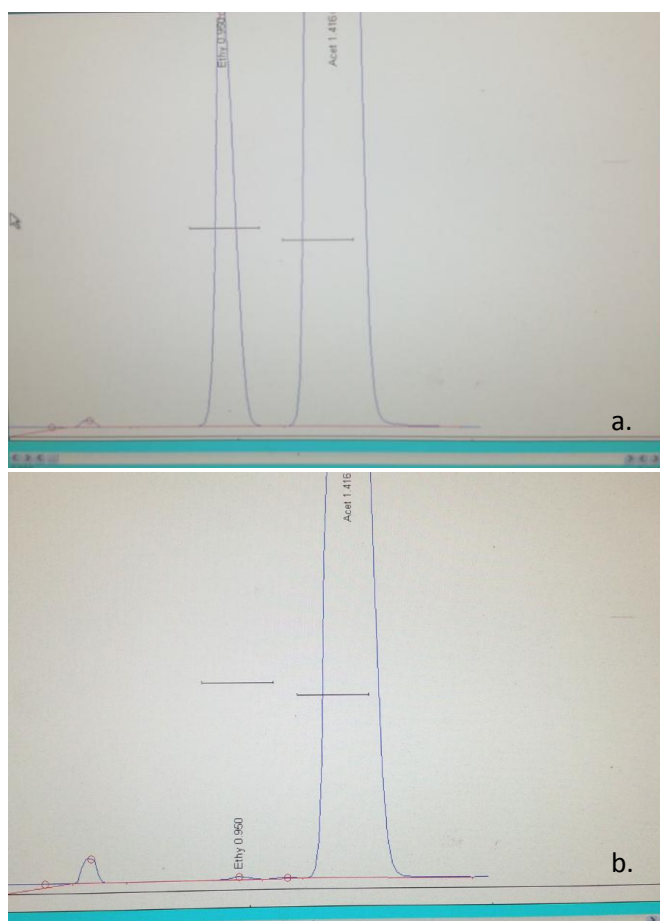


Figura 13. Lectura cromatógrafo de gases. a. Cromatograma mostrando conversión de acetileno a etileno. b. control (-) donde no se observa conversión de gases.

6.2.5 Identificación molecular para el gen *nifH*; como prueba confirmativa de la enzima nitrogenasa usando los primers CVV e IGK.

Para la extracción de ADN se usó el protocolo usando la técnica reportada por (Moore E. *et al.*, 2004). Las cepas aisladas fueron cultivadas en caldo de cultivo Merck® por 24 horas, después fueron mezcladas en tubos Eppendorf de 2 ml con un volumen de 3 ml del cultivo se llevaron a microcentrífuga a 10000 RPM a 10 min.

El pellet formado fue re suspendido en 564µl TE buffer y se realizó la extracción de ADN usando CTAB (ANEXO 14).

La pareja de iniciadores utilizada fue CVV(5´- GGT TGT GAC CCG AAA GCT GA - 3´) y IGK (5´- GCG TAC ATG GCC ATC ATC TC -3´), para amplificar un fragmento de aproximadamente 400 pb del gen nifH de las bacterias.

Las reacciones de PCR (por sus siglas en ingles de Reacción en Cadena de la Polimerasa) se realizaron en un volumen final de 25 µl e incluyeron un control negativo de agua (No Template Control NTC) y DNA de las cepas referencia *Klebsiella pneumonia* control (-), *Azotobacter vinelandii* control (+), *Paenibacillus* sp control (+) obtenidas del Departamento de Microbiología de la Universidad de Georgia Tech (Atlanta).

Todas las amplificaciones fueron realizadas en un termociclador Eppendorf ® y el programa de PCR consistió de un paso de desnaturación a 95°C por 3 min, desnaturalización a 95°C por 45 s, anillaje a 58°C por 30 s y extensión a 72°C por 1min (40 ciclos) y una extensión final de 10 min a 72°C.

6.3 Evaluación del efecto promotor de las cepas seleccionadas y su relación con las dosis de urea en plántulas.

6.3.1 Preparación del inóculo para pruebas en campo

Después de realizar la selección de las mejores cepas, teniendo en cuenta la velocidad de crecimiento, capacidad de crecimiento en medio con vinaza, producción de hormonas de crecimiento y fijación de nitrógeno, se determinó que las dos cepas con valores altos en los anteriores criterios fueron la cepa diecinueve y la cuatro.

Por lo anterior se prepararon inóculos de concentraciones de 10^7 cel/ml en Caldo Tripticasa Soya (TSB) para evaluar su efecto promotor en pruebas de vivero; para esto se usaron matraces de 3000 ml con un volumen efectivo de 1500 ml y un 10% de inóculo; las fiolas con cada una de las cepas fueron llevadas a una agitación continua de 100 rpm a una temperatura ambiente por 24 horas.

6.3.2 Material vegetal

La inoculación se llevó a cabo en condiciones de esterilidad para asegurar únicamente la interacción entre las semillas o yemas de caña y la cepa de la bacteria inoculada. Se cortaron semillas de caña variedad CC 85-92, las cuales se esterilizaron superficialmente con una solución de hipoclorito de sodio al 30%, seguido de tres lavados con agua estéril. La inoculación de las yemas se realizó sumergiendo las yemas por 10 min en la solución con el inóculo a una concentración de 10^9 cel/ml (Bautista & Gallardo, 2008).

Las semillas fueron colocadas según el tratamiento en materas con capacidad para 30 Kg (Figura 14) a una profundidad de 1 cm. El tipo de sustrato base utilizado fue un suelo molisol Udic Haplustolls serie SINAÍ (SK), tomado de la hacienda Holanda Naranjo, ubicada en el municipio de Padilla, coordenadas W 76° 20' 47" N3 12' 35" al cual se le realizó análisis físico-químico (Tabla 6) y posteriormente se esterilizó por solarización. El conjunto de lo anterior constituyó una unidad experimental.



Figura 14. Método de siembra de las semillas de caña de azúcar.

Tabla 6. Análisis de suelos Laboratorio de suelos del Ingenio Providencia S.A

pH V:V 1:1	CE dS/m	MO W.B %	P Bray II ppm	P Fijación %	S ppm	N Kjeldahl	Cationes Intercambiables Meq/100g				CIC	Ca/Mg	PSI	PMgl
							Ca	Mg	K	Na				
6,6	2,98	1,35	91,19	2,19	Trazas	0,06	9,25	4,71	0,21	0,15	19,29	1,96	0,76	24,42

Saturación de bases (%)				Elementos menores ppm					Textura Bouyoucos %			Clasif Text.
Ca	Mg	K	Na	B	Cu	Fe	Mn	Zn	Arena	Limos	Arcillas	
64,61	32,90	1,47	1,03	0,28	4,84	102,25	14,15	2,44	35,12	38,00	26,88	F

Fuente: Ingenio Providencia S.A IPSA.

6.3.3 Determinación de la fertilización nitrogenada

Se empleo un diseño factorial 3 x 4; para dos niveles de fertilización biológica (Presuntiva *Azotobacter* spp 1 (cepa 4), Presuntiva *Azotobacter* spp 2 (cepa 19) y control sin aplicación y 4 dosis de urea (100,75, 50, 0%). Cada tratamiento tuvo tres repeticiones. Para un total de 36 unidades experimentales (Tabla 7). La fertilización se realizó en forma escalonada a partir de los 30 días después de la siembra, y los tratamientos de fertilización se establecieron según el modelo:

$$X_{ijk} = \mu + \alpha_i + \beta_j + (\alpha\beta)_{ij} + e_{ij} \quad \text{Ecuación 2}$$

Donde:

X_{ijk} = Es una observación representativa.

k= 1,2,3. i = 2 j= 4

μ = Media General

α = Efecto del factor *Azotobacter* sp (cepas 19 y 4)

β = Efecto del factor dosis de urea (100,75, 50 y 0%)

$(\alpha\beta)$ = Efecto de la interacción de los factores $\alpha\beta$

e_{ij} = Representa el error experimental (Wayne, 1993).

Tabla 7. Resumen diseño del experimento.

Unidad experimental	Factor 1	Niveles factor 1	Factor 2	Niveles factor 2
Materas	Aplicación de bacterias	- Bacteria 1cepa 4 - Bacteria 2 cepa 19 - Sin bacteria control (-)	Aplicación de fertilizante nitrogenado	100 % urea 75% urea 50% urea 0% urea

La distribución de los tratamientos se realizó al azar y las variables se tomaron en una estructura de medidas repetidas con cuatro evaluaciones en el tiempo (antes de la fertilización y a los 30, 60 y 90 días después de la siembra) (Wayne, 1993). El experimento se mantuvo bajo condiciones de invernadero por tres meses temperatura promedio de 24° C y humedad de 83%.

6.3.3.1 Hipótesis

H_a = No todas las μ_j son iguales

H_a = Al menos un par de poblaciones no tienen medias iguales, por lo tanto uno de los tratamientos presenta diferencias en el desarrollo fisiológico de la caña de azúcar.

6.3.3.2 Medición de variables de crecimiento

La evaluación agronómica de la incorporación del producto bio-fertilizante, se cuantificó a través de la respuesta del cultivo en las siguientes variables de respuesta fisiológicas:

- Altura de brotes
- Peso fresco raíces, tallos y hojas
- Nitrógeno Foliar (por el método de Kjeldahl)

También se usó como variables explicatorias las mediciones de nitrógeno del suelo (por el método de Kjeldahl) (Gómez, 2008).

6.3.3.3 Altura de brotes

Para las mediciones se tomaron por cada unidad experimental la altura desde el suelo hasta la primera lígula visible, cada 30, 60 y 90 días después de la siembra y se contaron el número de macollos obtenidos (Figura 15). Se procedió a realizar las mediciones con regla.



Figura 15. Acomodación de las unidades experimentales en condiciones de vivero.

6.3.3.4 Mediciones del peso fresco y seco de las raíces.

Después de los tres meses, época en la que se llega al macollamiento, se realizaron mediciones de peso seco por cada unidad experimental usando una balanza; para esto se realizó un proceso de secado durante 48h a 105°C, separando las partes aéreas, los tallos y las raíces de las plantas.

6.3.3.5 Nitrógeno foliar

El nitrógeno fue medido a los 90 días; las muestras de material vegetal fueron molidas y mezcladas para obtener muestras compuestas por cada tratamiento y se procedió a la determinación de nitrógeno por el método de KJELDHAL (1982) a partir de tres alícuotas de 200 mg en el laboratorio de análisis fisicoquímico del ingenio Providencia S.A.

6.3.4 Elección de la mejor combinación de factores.

Los datos obtenidos fueron llevados a una matriz de datos en el programa estadístico MINITAB, con el nombre del tratamiento, edad y fecha de muestreo. Estos resultados se sometieron a un análisis para comprobar la normalidad de los datos (Tabla 8), para esto se empleó la prueba de Shapiro – Wilk, en la cual se

prueba la normalidad de los residuales para la cual las todas las variables tuvieron un valor de $p > 0.05$ lo que sugiere que tiene una distribución normal.

La $H_0 =$ para esta prueba indica que los residuales tiene distribución normal con media cero y varianza constante. Como todos los $p > 0.05$ no hay evidencia para rechazar la H_0 , acepto la H_0 ; por lo tanto todos los datos se comportan como una normal.

Tabla 8. Resumen normalidad de los datos; usando la prueba de Shapiro-Wilk.

Supuesto de Normalidad	Estadístico	P - valor
	W	Pr<W
Altura	0.981166	0.1299
Raíz	0.958332	0.1909
Tallo	0.959114	0.2018
Hoja	0.985453	0.9075
Nitrógeno Foliar	0.956238	0.1642

Posteriormente se realizó un análisis de varianza (ANOVA) para evaluar el efecto de los tratamientos sobre el desarrollo de las plantas.

7 RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

7.1 Aislamiento e identificación de cepas nativas.

7.1.1 Muestreo de suelos y aislamiento primario.

De las 15 muestras de plantas de caña de azúcar se obtuvieron 25 aislamientos ubicados en hojas, tallo y raíces (Figura 16). Después de un periodo de incubación de 15 días.

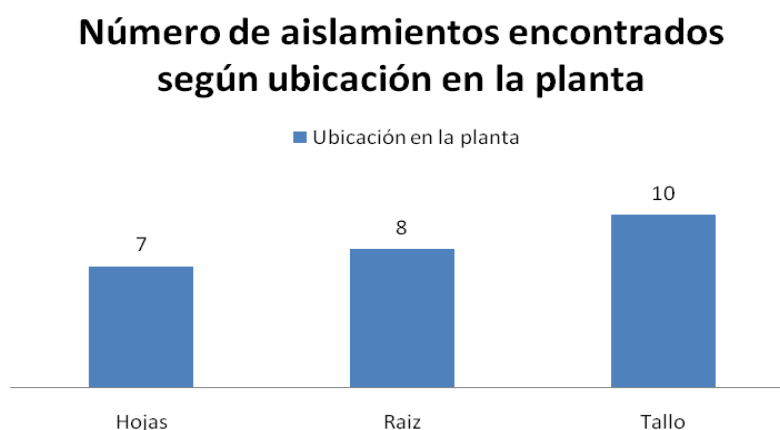


Figura 16. Número de aislamientos encontrados por ubicación en la planta.

Algunas colonias presentaron textura trasparente y brillantes con forma irregular y después presentaron un oscurecimiento característico del género (Avella, 2007). Mediante el método de macerado de raíz con suelo rizosférico, tallo y hojas, se lograron asilar cepas presuntivas de *Azotobacter* sp ; similares a las encontradas por (Borda et al., 2009); según (Rives et al., 2007) existen diferentes métodos de aislamiento; en la actualidad se usa el aislamiento directamente del suelo o la raíz y los lugares más factibles son: el suelo rizosférico, la superficie y los tejidos de la raíz; muy consecuente con lo encontrado en esta investigación.

El mayor número de aislados se encontró en los macerados de tallos con diez cepas (Figura 10), resultados similares a los encontrados por (Cracogna et al., 2003) con nueve cepas a los ocho meses de edad del cultivo; según (Loredo et al., 2004) la cantidad de cepas aisladas es un parámetro que se encuentran relacionado con las propiedades físicas, químicas y microbiológicas del suelo (Fischer et al., 2011). Además de las características de la variedad y la disponibilidad de nutrientes en la rizosfera; en el caso de la caña de azúcar, se ha demostrado una compatibilidad planta- bacteria; las raíces pueden seleccionar

a subpoblaciones específicas de la microbiota del suelo; esta selección se relaciona con la edad y el genotipo de la planta (Lemanceau *et al.*, 1995, Dos Reis J., 2000).

También se puede observar que la materia orgánica del suelo donde se extrajeron las muestras (Tabla 5), se encontraba en baja (1.60 %), al igual que el pH (5.2) lo que no favorece el desarrollo de la especie *Azotobacter* sp (Korndorfer *et al.*, 2004, Avella, 2007). También la conductividad eléctrica es baja (0.19 dS/m) lo que indica que no se tienen problemas de salinidad (Borda *et al.*, 2009) que puedan afectar el crecimiento de microorganismos.

Los niveles de fósforo (2.19) y potasio son bajos (1.47); lo que puede afectar el desarrollo del cultivo y de los microorganismos, debido a que estos elementos catalizan procesos importantes como la respiración, la fotosíntesis, la formación de clorofila y regulación del contenido de agua en la hojas; así mismo está ligado al transporte y acumulación de azúcares dentro de la planta (Otero, 2011). En cuanto al calcio (9.25), se observa que son altos y están asociados a bajos contenidos de magnesio (4.71) y potasio (0.21), lo que ocasiona un desbalance y por ende baja disponibilidad para las plantas. Con respecto a los elementos menores como manganeso, zinc y boro, se encuentran en concentraciones normales.

A pesar de las características de suelo, se obtuvieron 25 aislamientos (Tabla 5) que presentaron morfologías claras, medianas, irregulares y brillantes, morfología reportada para bacterias del género *Azotobacter* (Aguero M., 2009) (Borda *et al.*, 2009); sin embargo, según (Avella, 2007), algunas colonias pequeñas traslucidas y brillantes, muy similares a las reportadas para *Azotobacter*, pueden también presentarse en otros géneros fijadores de nitrógeno asimbióticos como *Beijerinckia*. También se conoce que en suelos tropicales como los del Valle del Cauca, con pH más o menos neutros o ligeramente ácidos, los géneros *Derxia* y *Beijerinckia* son más representativos que *Azotobacter*.

7.1.2 Aislamiento secundario, Macroscopía y Microscopía.

Los 25 aislamientos purificados obtuvieron los siguientes resultados en morfología y tinción de Gram (Tabla 9). Según las observaciones macro y microscópicas se determinaron cinco cepas como presuntivas del género *Azotobacter* sp. Las cepas cuatro, once y diecinueve fueron obtenidas de tallos, por el contrario la cepa cinco fue obtenida de raíz y la veinte de hojas.

De los aislamientos primarios en medio Ashby se pudieron caracterizar cinco cepas similares a las halladas por (Torriente, 2010) definidas como colonias lisas, grandes y ligeramente convexas, primeramente brillantes y traslúcidas, tornándose más tarde opacas cremosas y de color beige a carmelita, con un halo difuso alrededor de la colonia, que según (Borda *et al.*, 2009) es consecuencia de la solubilización del carbonato de calcio (Figura 9).

Estas colonias también mostraron pigmentación lo que concuerda con lo encontrado por (Avella, 2007, Borda *et al.*, 2009), donde sostiene que el género *Azotobacter* tiene la capacidad de producir pigmentos solubles, en medio Ashby – benzoato, debido a que el benzoato es tomado como fuente de carbono y metabolizado por medio de la vía B- ceto adipato, que genera succinato que es introducido a la cadena respiratoria mediante el sistema dependiente de flavina, el cual está relacionado con la pigmentación del medio.

Tabla 9. Macroscopía y microscopias de aislamientos encontrados por ubicación en la planta.

CÓDIGO	MORFOLOGÍA	BORDE	CONSISTENCIA	PIGMENTACIÓN	SUPERFICIE	GRAM	FORMA 1000X
1	PUNTIFORME	ENTERO	MEMBRANOSA	CREMA	RUGOSA	POSITIVO	COCOS
2	RIZOIDE	FILAMENTOSO	MEMBRANOSA	CREMA	FILAMENTOSA	POSITIVO	COCOS
3	IRREGULAR	LOBULADO	MEMBRANOSA	TRASPARENTE	LISA	NEGATIVO	ESPIRILOS
4	CIRCULAR	ENTERO	CREMOSA	PARDO	LISA	NEGATIVO	BACILOS
5	CIRCULAR	ENTERO	CREMOSA	PARDO	LISA	NEGATIVO	BACILOS
6	IRREGULAR	ENTERO	CREMOSA	AMARILLO	RUGOSA	NEGATIVO	BASTONES
7	PUNTIFORME	ENTERO	CREMOSA	BLANCAS	LISA	NEGATIVO	BASTONES
8	PUNTIFORME	LOBULADO	CREMOSA	TRASPARENTE	RUGOSA	POSITIVO	COCOS
9	RIZOIDE	FILAMENTOSO	MEMBRANOSA	BLANCAS	FILAMENTOSA	POSITIVO	COCOS
10	IRREGULAR	LOBULADO	CREMOSAS	AMARILLO	LISA	NEGATIVO	ESPIRILOS
11	CIRCULAR	ENTERO	CREMOSA	PARDO	LISA	NEGATIVO	BACILOS
12	REDONDA	REGULAR	CREMOSAS	AMARILLO	RUGOSA	NEGATIVO	ESPIRILOS
13	REDONDA	ONDULADO	CREMOSAS	CREMA	LISA	NEGATIVO	ESPIRILOS
14	PUNTIFORME	REGULAR	MEMBRANOSA	TRASPARENTE	LISA	POSITIVO	COCOS
15	IRREGULAR	LOBULADO	MEMBRANOSA	BLANCAS	RUGOSA	NEGATIVO	COCOS
16	IRREGULAR	LOBULADO	MEMBRANOSA	AMARILLO	RUGOSA	POSITIVO	CADENETAS
17	RIZOIDE	FILAMENTOSO	MEMBRANOSA	BLANCAS	FILAMENTOSA	NEGATIVO	COCOS
18	PUNTIFORME	LOBULADO	MEMBRANOSA	TRASPARENTE	LISA	NEGATIVO	ESPIRILOS
19	CIRCULAR	ENTERO	CREMOSA	PARDO	LISA	NEGATIVO	BACILOS
20	CIRCULAR	ENTERO	CREMOSA	PARDO	LISA	NEGATIVO	BACILOS
21	CIRCULAR	REGULAR	CREMOSA	AMARILLO	LISA	NEGATIVO	CADENETAS
22	RIZOIDE	FILAMENTOSO	MEMBRANOSA	TRASPARENTE	FILAMENTOSA	POSITIVO	COCOS
23	RIZOIDE	FILAMENTOSO	CREMOSA	BLANCAS	FILAMENTOSA	POSITIVO	COCOS
24	IRREGULAR	ONDULADO	MEMBRANOSA	TRASPARENTE	RUGOSA	POSITIVO	CADENETAS
25	IRREGULAR	ENTERO	MEMBRANOSA	AMARILLO	RUGOSA	NEGATIVO	COCOS

7.1.3 Pruebas Bioquímicas.

Los cinco aislamientos purificados obtuvieron los siguientes (Tabla 10) resultados en las pruebas bioquímicas. Estas cinco cepas presentaron resultados bioquímicos similares a los encontrados por (Gonzales & Barraquio, 2000, Avella, 2007); y exactos a los reportados por las cepas de referencia NCIM 8660 (Tabla 6); las cepas cuatro, cinco, diecinueve y veinte fueron negativas para benzoato; sin embargo *A. paspali*, *A. armeniacus* y *A. nigricans* también son negativas en

esta prueba. Para la prueba de Oxidasa las cepas cuatro, once y veinte fueron negativas, no obstante se ha reportado que especies como *A. beijerinckii*; *A. armeniacus*; *A. nigricans* y *A. chroococcum* un 11% de las especies puede ser negativo para oxidasa (Aquilanti et al., 2004).

Tabla 10. Pruebas bioquímicas para las cepas presuntivas.

Pruebas Bioquímicas	4	5	11	19	20	Control (<i>A. vinelandii</i> NCIM 8660)
Arabinosa	+	+	+	+	+	+
Manosa	+	+	+	+	+	+
Sacarosa	+	+	+	+	+	+
Melibiosa	+	+	+	+	+	+
Maltosa	+	+	+	+	+	+
Sorbitol	+	+	+	+	+	+
Manitol	+	+	+	+	+	+
Adonitol	+	+	+	+	+	+
Galactosa	+	+	+	+	+	+
Glucosa	+	+	+	+	+	+
Benzoato	-	-	+	-	-	+
Catalasa	+	+	+	+	+	+
Oxidasa	-	+	-	+	-	+

7.2 Discriminación de las cepas de *Azotobacter* spp eficientes para el proceso.

7.2.1 Crecimiento bacteriano.

Los promedios de los resultados de las lecturas por triplicado de las absorbancias para cada cepa, se muestran en la siguiente figura (Figura 17).

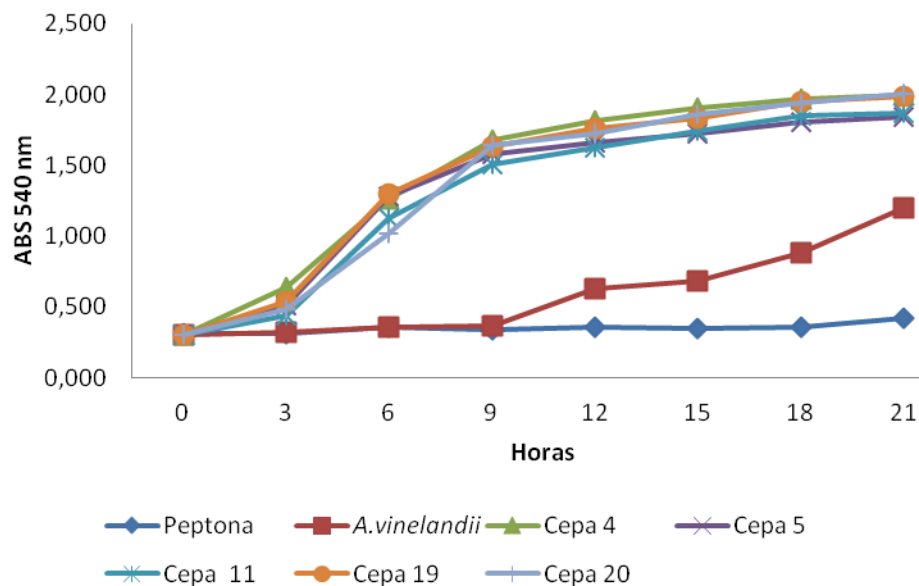


Figura 17. Crecimiento por absorbancia.

El mayor crecimiento se observó para las cepas diecinueve (1.986 ABS), cuatro (1.991 ABS) y veinte (2.007 ABS) (Figura 17). Lo que indica que los microorganismos nativos tuvieron un desarrollo más acelerado que la cepa control de *A. vinelandii*. Lo que indica la posibilidad de usar este tipo de microorganismos para una producción industrial; dado su rapidez en alcanzar la fase exponencial del cultivo.

Los resultados obtenidos en el proceso de crecimiento en placa se registran en la figura 18, los valores de recuento se presentan en logaritmo para obtener un comportamiento lineal de los datos.

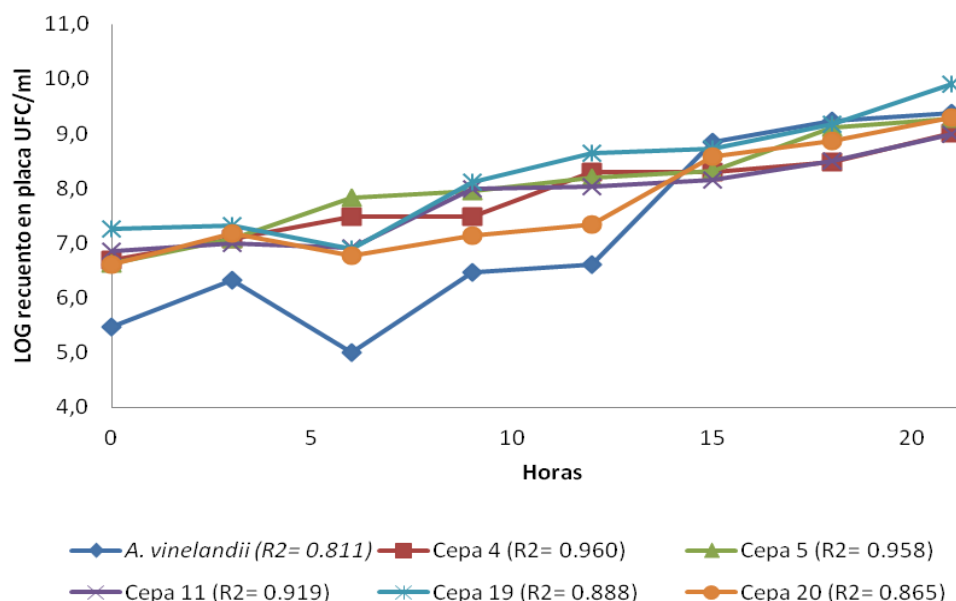


Figura 18. Crecimiento por recuento en placa.

Los resultados de las curvas de crecimiento de las bacterias seleccionadas mostraron que a las nueve horas se presentó una desaceleración en el crecimiento de las cinco cepas bacterianas estudiadas (Figura 18), lo que indica, según (Gaitán, 1998), que las bacterias ya no se encontraban en su óptimo de actividad metabólica; siendo el aumento de concentración de biomasa despreciable comparado con el tiempo y la energía.

La cepa 19 fue la que alcanzó la mayor concentración bacteriana (1.30×10^8 UFC/l) a las nueve horas de seguimiento (Figura 18), seguida por el aislado 11 (1.00×10^8) muy similar a lo encontrado por (Echeverría & Koch, 2007) y (Aguero M., 2009) 1.00×10^8 como concentración mínima requerida para obtener un inoculante biológico. Según el Comité Estatal de Normalización de Cuba (1992), la concentración mínima de *Azotobacter* que se debe inocular al suelo para que actúe como biofertilizante es 1.00×10^8 células/ml.

El control con *A. vinelandii* presentó el menor crecimiento con 2.90×10^6 a las nueve horas; solo hasta las 21 horas alcanzó un crecimiento similar a las cepas nativas con un recuento de 2.40×10^9 . Las cepas con mayor crecimiento a las 21 horas en ese orden fueron la cepa 19 (7.80×10^9), cepa 20 (2.0×10^9), cepa 5 (1.90×10^9), cepa 4 (1.0×10^9), por último la cepa 11 (9.50×10^8). Se puede notar

que son valores altos si se comparan con los encontrados por (Borda *et al.*, 2009, Agüero M., 2009) $6,0E+08$ células/mL para *Azotobacter*; a las 32 horas.

7.2.2 Crecimiento en vinaza

Se realizó con una mezcla directa de las cepas nativas y de las cepa referencia a la vinaza, en la figura 19 se observan los resultados de la prueba indican la capacidad de las cepas de resistir a la concentración del 20% de vinaza.

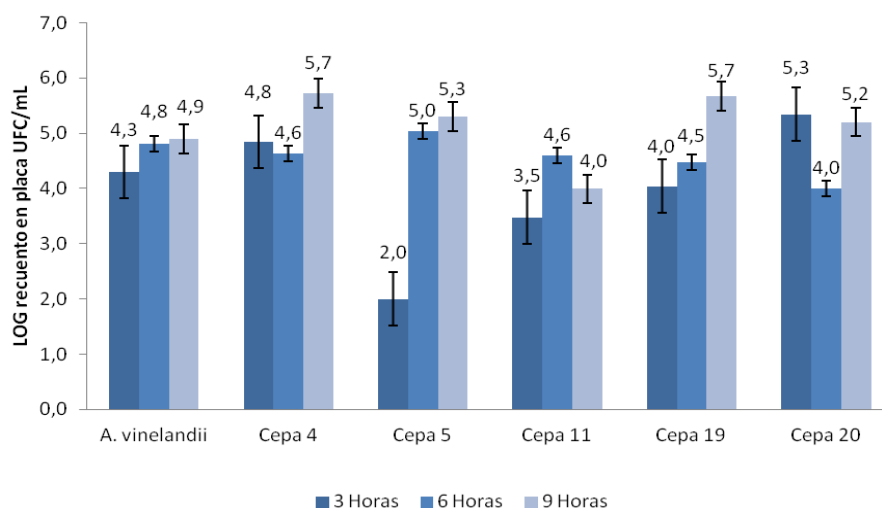


Figura 19. Resistencia y crecimiento vinaza.

En la figura 12 se pudo observar que la cepa 11 presentó el menor crecimiento ($9.8E+03$), seguido por el control con *A. vinelandii* con $7.30E+04$, continuando con las cepas veinte y cinco ($1.60E+05$ y $1.80E+05$), las de mejor crecimiento fueron las cepa diecinueve y cuatro con $4.70E+05$ y $5.30E+05$. Aunque sus crecimientos no cumplen con los requerimientos de un bioinóculo (Bashan *et al.*, 1996) sostiene que el nivel óptimo en semillas y plántulas de cultivo comerciales, es de alrededor de $1.0E+05$ - $1.0E+06$ UFC/mL.

Se puede notar un decrecimiento al comparar los recuentos de las bacterias en el medio de cultivo TSA contra el medio de cultivo con vinaza al 20%, esto puede ser debido a que la vinaza constituye un medio hostil dado que tiene una alta conductividad eléctrica (0.71 ds/m) y un pH bajo (4.33); según (Rodríguez *et al.*, 2005) el pH y las fuentes nutricionales del medio de cultivo influyen sobre la actividad nitrogenasa de las cepas representativas de la comunidad endófitas.

Sin embargo; se puede notar que las bacterias nativas presentan mayor crecimiento y resistencia a las condiciones de la vinaza en comparación con el

control, esto es debido a que estos suelos ya han recibido aplicaciones de vinaza (8000L /ha). Lo que indica que estas bacterias nativas pueden estar desarrollando adaptaciones y estar usando como fuente de carbono algunos compuestos presentes en la vinaza; lo que puede ser materia de estudios posteriores(Carbono Orgánico 9.30%)(Resende *et al.*, 2006).

Este subproducto de la industria del alcohol tiene altos contenidos de carbono orgánico y algunos azúcares reducidos (Korndorfer *et al.*, 2004), según (Rodríguez C. *et al.*, 2005) la fructosa es el azúcar que más favorece la actividad nitrogenasa.; también la sacarosa, el guarapo y la glucosa constituyen fuentes carbonadas que favorecen esta actividad enzimática, pero existen diferencias entre cepas (Garzón *et al.*, 2001, Agüero, 2009); esto pudiera explicarse por el rendimiento de ATP obtenido por molécula de carbohidrato utilizada, por lo que un mayor rendimiento favorece tanto el crecimiento como la actividad nitrogenasa de los diazotófos estudiados. Además, la fructosa y la sacarosa son los azúcares que se encuentran en mayor proporción en el jugo de la caña de azúcar, hábitat natural de estos endófitos, por lo que ellos poseen las enzimas necesarias para su degradación (Echeverría & Koch, 2007, Gómez, 2008).

7.2.3 Síntesis de compuestos indólicos- producción de ácido indolacético (AIA).

Las fitohormonas contribuyen al funcionamiento de diversos procesos biológicos en las plantas, incluyendo la regulación de la quiescencia y germinación de semillas, la formación de raíces. A su vez, incrementan la resistencia de las plantas a factores ambientales y pueden inducir o suprimir la expresión de genes y la síntesis de enzimas, pigmentos y metabolitos. El mecanismo de acción directo de las PGPRs por excelencia es la producción de reguladores de crecimiento vegetal (Tsavkelova, *et al.*, 2006) citado por (Lee *et al.*, 2004, Gallegos & Quispe, 2009)

El mecanismo analizado con mayor amplitud es la producción de auxinas, especialmente la del ácido 3-indolacético (AIA) (Fuentes R. *et al.*, 1993, Bautista & Gallardo, 2008), El triptófano es considerado el precursor del AIA, ya que cuando se añade a los cultivos bacterianos aumenta su producción; por esto, las vías de síntesis dependientes de triptófano son las más estudiadas. Dentro de estas se encuentran: la vía ácido indol-3-pirúvico, la vía indol-3-acetamida y la vía Indol- 3-acetonitrilo (Torres R. *et al.*, 2000, Rives *et al.*, 2007).

Se encontró una ecuación con un índice de correlación del 0.99 (Figura 11). Las dos mejores cepas productoras de AIA y otros compuestos indólicos y metabolitos relacionados, fueron la cepa cuatro y la diecinueve, con 0.90 y 0.98 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de AIA a las 40 horas de lectura (Figura 20), superiores al control (*A. Vinelandii*) con 0.35 $\mu\text{g}/\text{ml}$; lo que indica el potencial de estas cepas nativas para su uso en bioinoculantes que estimulen el crecimiento en el cultivo de la caña de azúcar. Estos resultados son similares a lo encontrado por (Borda M. *et al.*, 2009), donde encontraron una producción de AIA promedio de 38,4 mg/ml a las 150 horas. También (Bautista & Gallardo, 2008) obtuvieron concentraciones de AIA aproximadamente de 60 $\mu\text{g}/\text{ml}$ en el medio BT y 72 $\mu\text{g}/\text{ml}$ en el medio TSB, en el sexto día de cultivo.

Por otra parte (Rodríguez C. *et al.*, 2005) encontraron en el aislado 17, aislado 30 y aislado 305 de bacterias endófitas de caña de azúcar, capacidad de producir AIA con valores entre 1,7 y 2,5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ a las 72 horas. Los valores de AIA obtenidos, son similares a lo informados por (Fuentes R. *et al.*, 1993), los cuales estimaron por HPLC que la cepas de *Gluconacetobacter diazotrophicu* producen entre 0.14 y 2.42 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de AIA. También (Rodríguez C. *et al.*, 2005) encontraron cuantificación de AIA en sobrenadantes de cultivos bacterianos mediante el método de Salkowski entre 1.7 y 2.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de AIA.

La cepa control de *A. Vinelandii* obtuvo 0.35 $\mu\text{g}/\text{ml}$, sin embargo mediante la técnica de Salkowsky (Bautista & Gallardo, 2008) encontraron en *A. vinelandii* y *A. brasilense* un comportamiento lineal en aumento en función del tiempo, para *A. vinelandii* se reporto 80 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de AIA comparado con *A. brasilense* que produjo menos de 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ después de 72 horas.

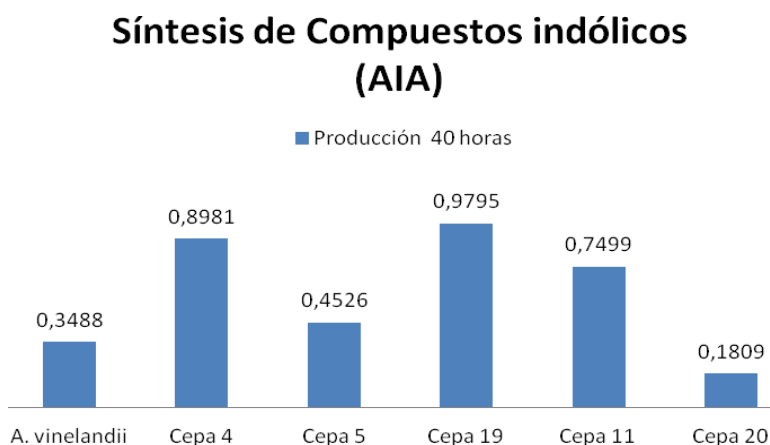


Figura 20. Síntesis de compuestos indólicos en $\mu\text{g}/\text{ml}$ de las cepas evaluadas.

7.2.4 Actividad de reducción de acetileno por cromatografía de gases (ARA).

La fijación biológica de nitrógeno (FBN) es la reducción enzimática de nitrógeno atmosférico (N_2) a amonio (NH_4). Este proceso es exclusivo de algunas bacterias (Loredo *et al.*, 2004), denominadas bacterias diazotróficas.

Los resultados de la actividad nitrogenasa para las cinco cepas evaluadas, muestran que las cepas 19, 20, 4 y 5 tienen mayor producción de etileno que el control con *Azotobacter vinelandii* (Figura 21) ; con valores de 1090.33, 797.92, 770.03, 386.17 nmol//h respectivamente y 180.11 nmol//h para el control. Inferiores a los obtenidos por (Otero, 2011) donde obtuvieron para la bacteria BFN 25 y *Azotobacter Chroococcum*, valores de 3151,8 y 2601,5 nmol/hora respectivamente, pero superiores a los encontrados por (Orozco J. & Martínez N., 2009) donde *Azotobacter chroococcum*, *Bacillus macerans*, *Enterobacter agglomerans* y *Pseudomonas* sp ; obtuvieron valores máximos de reducción de acetileno de 120, 18, 7 y 100 nmol etileno/hora, respectivamente.

Los valores deben sus diferencias a variaciones en la actividad de los microorganismos diazotróficos, dependiendo de la bacteria y de las condiciones del ensayo de reducción de acetileno, principalmente pH, presión de oxígeno, fuente de carbono y concentración de nitrógeno combinado, según (Orozco J. & Martínez N., 2009).

Por otra parte los valores bajos para la cepa 11 (86.04 nmol//h) muy por debajo de *Azotobacter vinelandii* usada como control (+) 180.11 nmol//h pueden ser debidos a que según (Loredo *et al.*, 2004) la Fijación Biológica de Nitrógeno (FBN) depende del estado en el cual se encuentra el nitrógeno en el suelo donde se aisló la bacteria y su relación con el estado y contenido de materia orgánica; este suelo presentaba valores bajos en nitrógeno 0.06% y materia orgánica 1.35%. También tiene una fuerte influencia las variaciones genéticas de cada bacteria aislada. (Dos Reis J., 2000).

Para las cinco cepas seleccionadas la lectura de ARA se realizó a los dos días de crecimiento, esto debido a que la fase exponencial de estas bacterias se alcanzaba antes de las 24 horas (Figura 21).

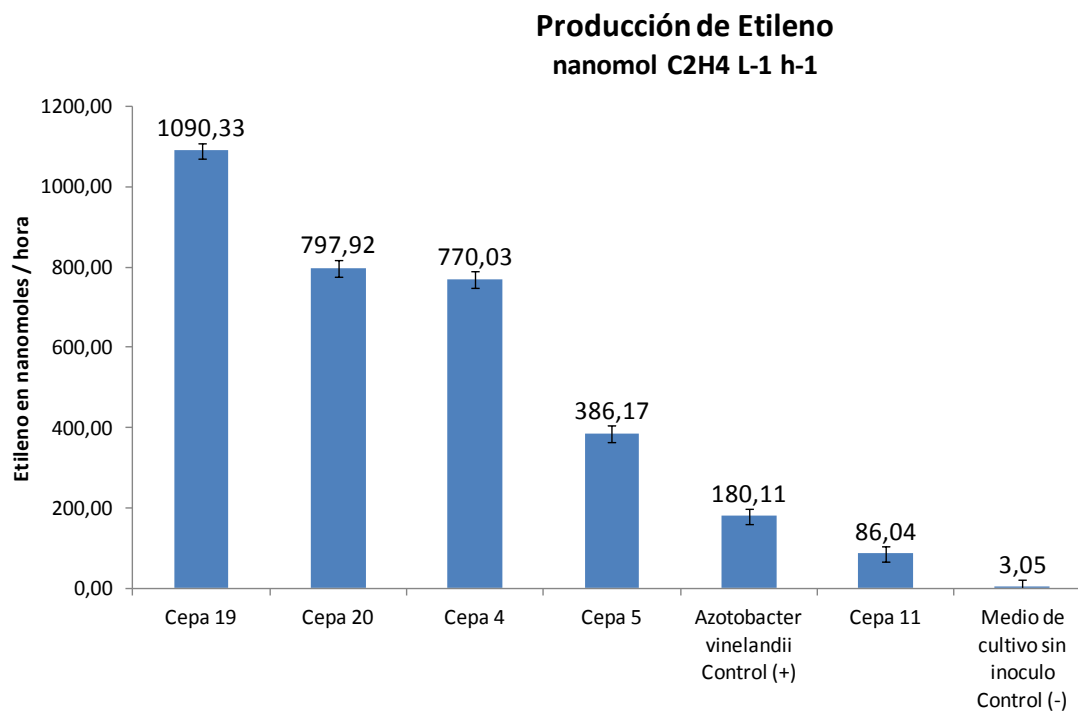


Figura 21. Conversión de acetileno a etileno y tasa de nitrógeno fijado por hora.

7.2.5 Identificación molecular para gen *nifH*; como prueba confirmativa de la enzima nitrogenasa usando los primers CVV e IGK.

El marcador molecular más empleado en la detección de microorganismos fijadores de nitrógeno molecular, es el gen *nifH* (Thaweenut *et al.*, 2011). Este gen codifica para la nitrogenasa y ha evolucionado a la par con los genes 16S rRNA, por lo tanto también se utiliza como marcador molecular en estudios de filogenia (Otero, 2011, Fischer *et al.*, 2011).

Los resultados muestran que cuatro de las cinco cepas evaluadas tienen la amplificación del gen. En la figura 22, se puede visualizar una banda correspondiente al fragmento con un tamaño esperado de 378 pb, en las cepas cuatro, 11, 19 y 20, excepto en la cepa 5 que no presenta banda.

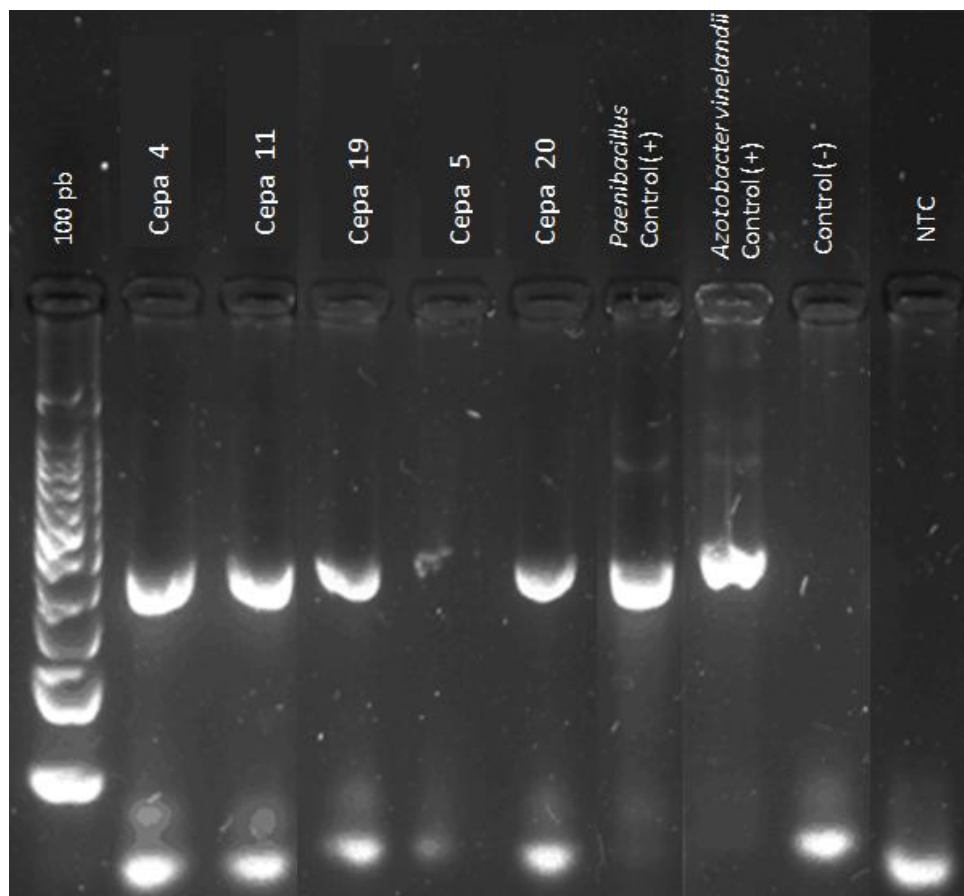


Figura 22. Amplificación del gen *nif H* en los aislamientos.

La amplificación de estos genes, es de gran importancia debido a que la presencia de microorganismos capaces de fijar nitrógeno no siempre es detectable por medio de cultivos, En la Figura 22 se puede notar que cuatro de las cinco cepas aisladas presentan amplificación para el gen *nif H*, lo que indica según (Otero, 2011) que estas bacterias fijan nitrógeno; sin embargo es de aclarar que la presencia del gen *nif H* no indica la fijación activa de nitrógeno (Thaweenut *et al.*, 2011), puesto que esta enzima presenta regulación pre y postranscripcional y su funcionamiento depende de las condiciones del medio ambiente (Otero, 2011).

Las bandas menores de 100pb corresponden a dímeros del cebador (Primer dimers) los cuales constan de moléculas que se han adherido (hibridado) entre sí a causa de las cadenas de complementarias de bases de los cebadores (Primers) (Ando *et al.*, 2005). Como resultado, la ADN-polimerasa amplifica el dímero cebador primer, que conduce a la competencia por los reactivos de la PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa); se ven típicamente como una base de par de bandas (pb) o mancha de moderada a alta intensidad y distinguible de la

banda de la secuencia diana, que es típicamente más largo que 50 pb 30-50. Un dímero Primer (PD) es un potencial de subproductos en la PCR.

7.3 Evaluación del efecto promotor de las cepas seleccionadas y su relación con las dosis de urea en semillas de caña.

7.3.1 Altura de brotes.

Los resultados para altura de los brotes a los 30, 60 y 90 días después de la siembra se muestran en las figuras 23 hasta la 27.

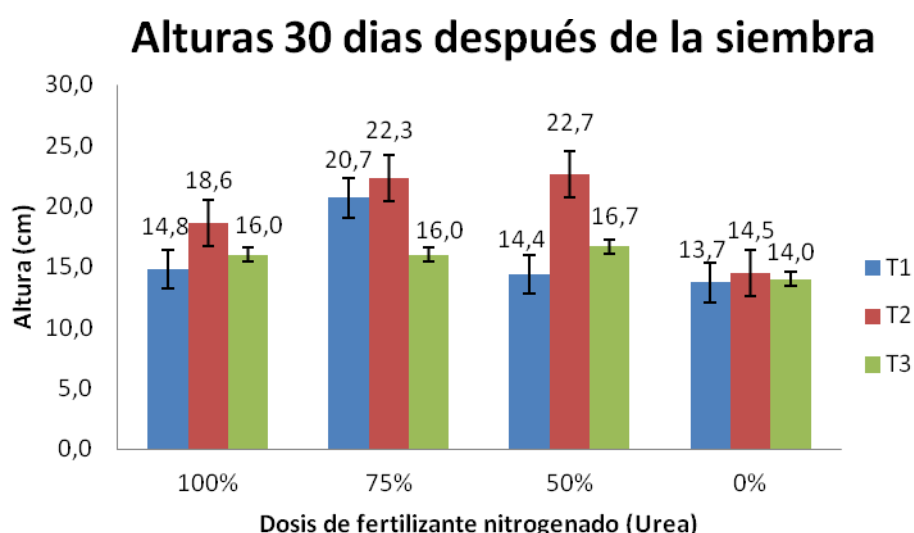


Figura 23. Altura 30 días después de la siembra (DDS) por tratamiento.

A los 30 días después de la siembra (DDS), se pudieron establecer diferencias significativas entre tratamientos $p < .0001$ (Figura 23), favoreciendo el tratamiento con la bacteria dos (Anexo 8), y el 50% de fertilización nitrogenada $p < .0001$. Se puede notar que la bacteria uno, fue inferior a la bacteria dos, esto puede ser debido a diversos factores que influyen en la supervivencia de los microorganismos del suelo, tales como el antagonismo microbiano y la competencia, (Loredo *et al.*, 2004); para el tratamiento control (T3) no se pudieron determinar diferencias significativas entre sus dosis de urea (Anexo 8).

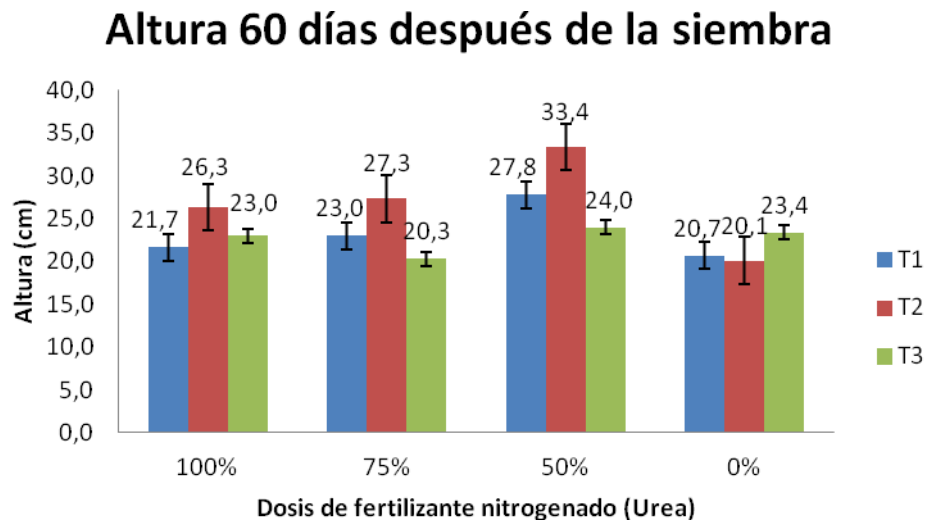


Figura 24. Altura 60 días después de la siembra por tratamiento.

A los 60 (Figura 24) días después de la siembra no se pudieron establecer diferencias significativas para la bacteria uno entre dosificaciones, esto puede deberse, también, a que la bacteria uno puede ser más susceptible que la bacteria dos, a factores como la humedad del suelo, el régimen de temperatura, el pH, la textura, el O₂ y la disponibilidad de nutrimentos; también para el control no se detectó diferencias entre dosificaciones de urea, el mejor tratamiento fue con la bacteria dos $p < .0001$, mostrando alturas superiores hasta de nueve centímetros en el tratamiento de 50% de urea.

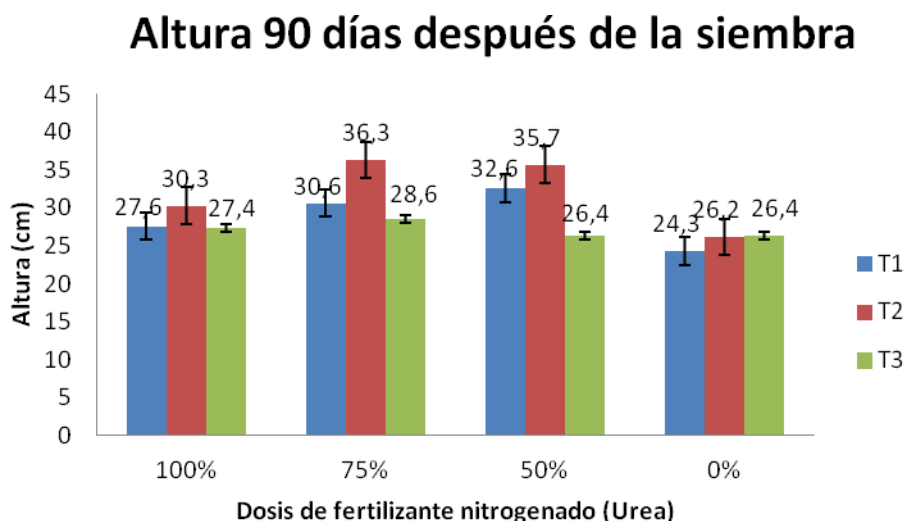


Figura 25. Altura 90 días después de la siembra por tratamiento.

A los noventa días después de la siembra (Figura 25), se tienen un desarrollo radicular que permite genera exudados para el establecimiento de las bacterias y el acceso de nutrientes hacia la planta (Kloepper *et al.*, 1991), en esta etapa el consumo de nitrógeno es alto y los efectos sobre la altura son más evidentes. Con el 100% de las dosis de urea se puede observar que no hay diferencias significativas entre tratamientos; esto puede deberse a que con altas dosis de nitrógeno, la actividad de las bacterias es disminuida.

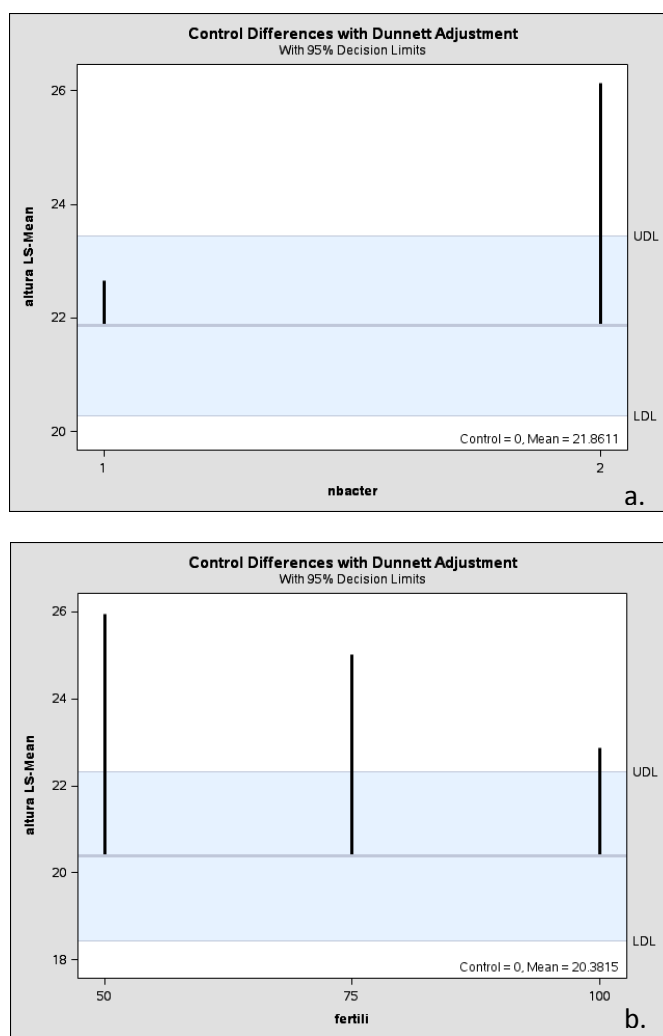


Figura 26. a. Diferencias significativas entre tratamientos favoreciendo la bacteria 2. b. Diferencias significativas entre dosis de urea siendo mejor 50% de la dosis.



Figura 27. Inoculación de la bacteria dos en plantas de caña de azúcar.

Con la dosis de urea a un 75%, se observa que hay un aumento en la altura para todos los tratamientos con respecto al tratamiento anterior, de tres centímetros para la bacteria uno, seis centímetros para la bacteria dos y solo 1.2 cm para el control. Estos aumentos pueden deberse a un mayor desarrollo de las bacterias con dosis más bajas de nitrógeno. También, se nota una diferencia significativa para la bacteria dos de 5.7 cm con respecto a la bacteria uno y de 7.7 cm con respecto al control.

Para el tratamiento con el 50% de urea, se pudo indicar que no hay un incremento en altura para los tratamientos, indicando que en el cultivo puede llegar a fertilizarse con la mitad de la dosis y obtenerse los mismos rendimientos (Figura 25); por otra parte la bacteria dos continua mostrando diferencias significativas entre la bacteria uno (3.1 cm) y el control (9.3 cm).

Para el tratamiento sin dosis de nitrógeno se pudo evidenciar que no hubo diferencias significativas, esto puede deberse a que el suelo tenía 0.06% de nitrógeno que pudo ser usado por las bacterias para su desarrollo; lo que se vio reflejado en el bajo crecimiento (Figura 27).

Finalmente en la Figura 26 se observan los resultados generados por el programa estadístico donde en la figura a. se destaca la bacteria dos como la de mejores promedios, superior a la bacteria 1; en la figura 2 se indican las diferencias significativas entre las diferentes dosificaciones de urea, favoreciendo al tratamiento con el 50%.

7.3.2 Pesos Secos

Como se observa en la Figura 28, no se determinaron diferencias significativas entre los tratamientos expuestos al 100% de la dosis de nitrógeno y los tratamientos con 0% nitrógeno ($p>0.898$), esto puede deberse a que según (Loredo *et al.*, 2004) la incapacidad de diversos inoculantes para mejorar el rendimiento de los cultivos, con frecuencia, se atribuye a la ineficiencia de estas bacterias para colonizar consistentemente la rizósfera. Si el inoculo es aplicado a la semilla, las poblaciones bacterianas se desarrollan más en la porción superior del sistema radical, sin colonizar abundantemente las porciones media y baja (Reyes & Valery, 2007).

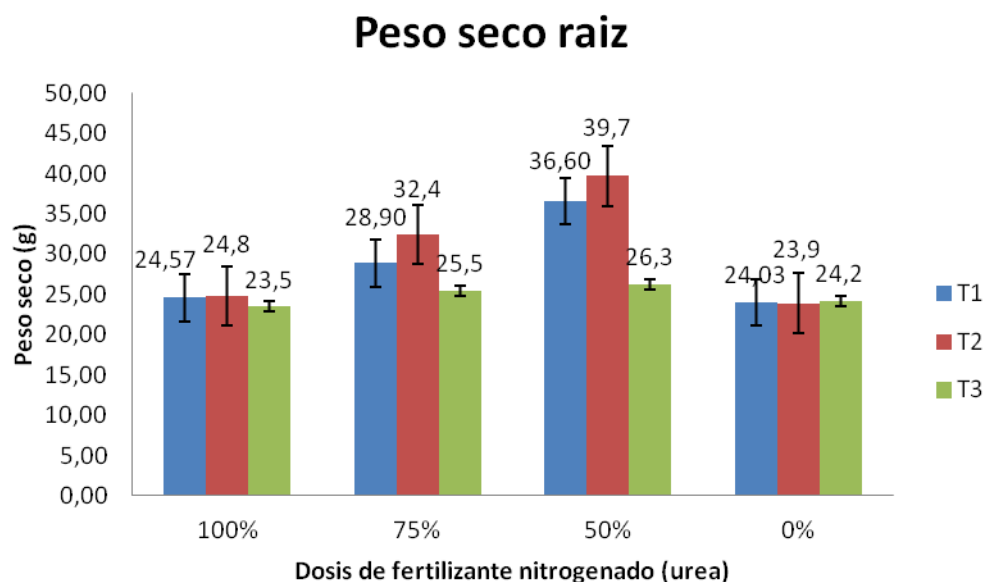
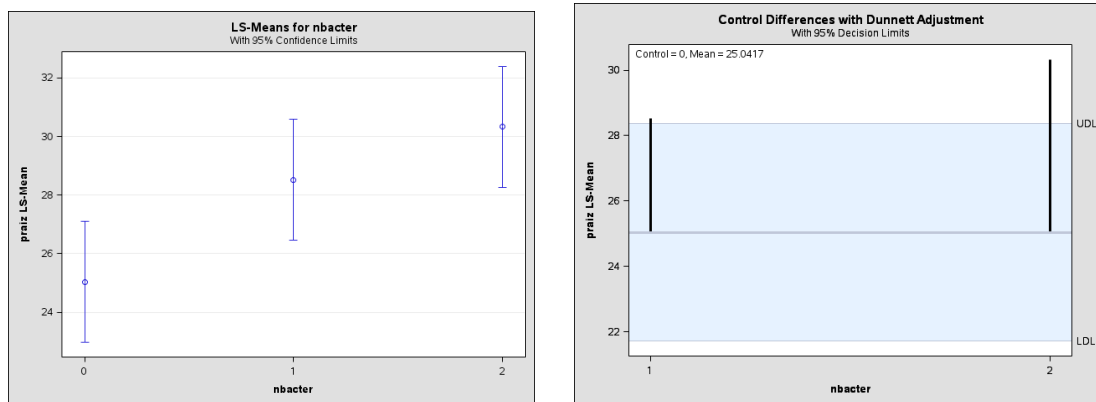


Figura 28. Peso seco de la raíz 90 días después de la siembra por tratamiento.



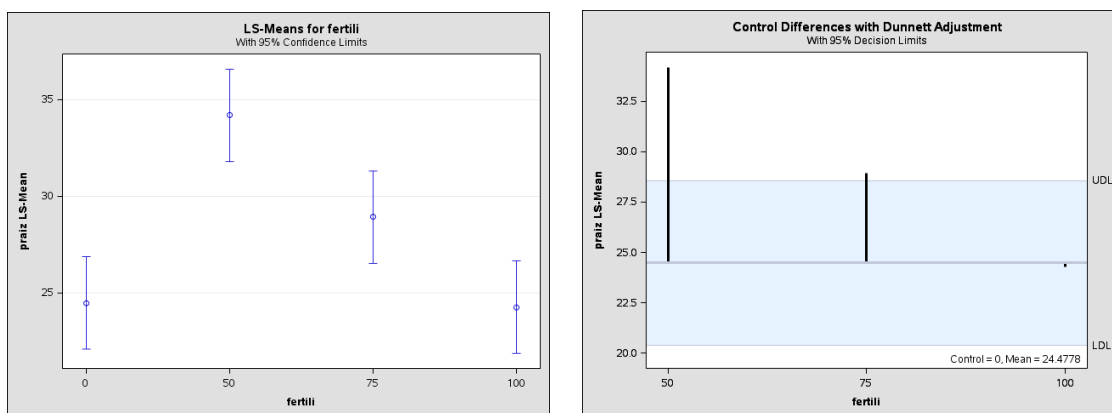


Figura 29. Diferencias significativas por tratamiento.

Sin embargo, cuando disminuye la dosis de nitrógeno a un 75% se pueden observar aumentos en el peso seco de las raíces para la bacteria uno aumento un 17,67%; para la bacteria dos aumento un 30.64% y solo un 8.5% para el control sin inoculación de bacterias. Además se pudieron establecer diferencias significativas favoreciendo el tratamiento con la bacteria dos ($p < 0.0020$) (Figura 29) (Anexo 9); favoreciendo lo dicho por (Bashan & Levanony, 1990) donde sostienen que al disminuir las dosis de nitrógeno se benefician los efectos de las bacterias (Fuentes *et al.*, 1999)(Figura 30).

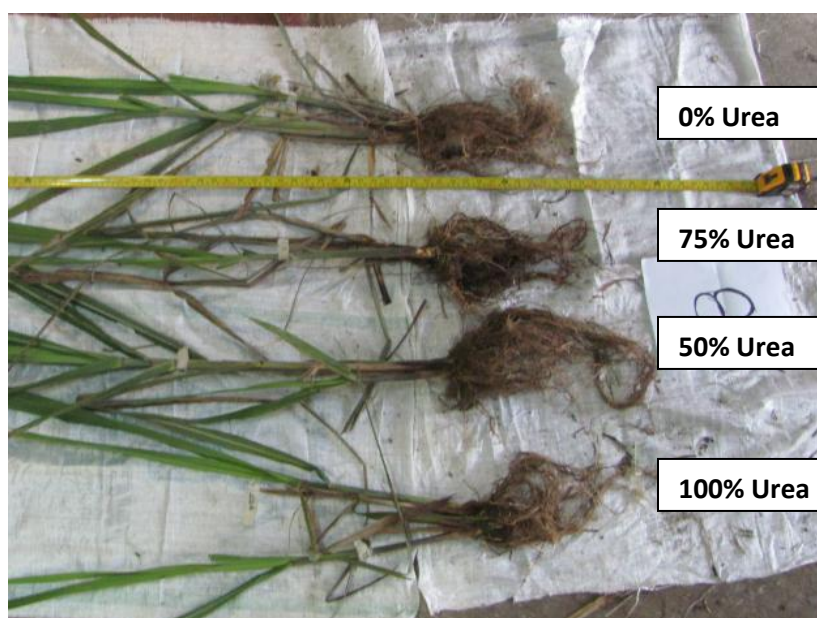


Figura 30. Observación de las plantas inoculadas con la bacteria dos, detalle de crecimiento radicular.

Es importante anotar que debido a que las bacterias se inocularon en condiciones asépticas, no tienen competencia, por lo cual la densidad de su población en la rizosfera probablemente está determinada sólo por la disponibilidad de carbono de los exudados (Loredo *et al.*, 2004). Sin embargo; la cantidad, la longitud y la edad de las raíces permanentes dependen de las variedades; sin embargo existen factores ambientales como el tipo de suelo y la humedad que influyen en estas características (Estévez *et al.*, 1995) (Palma &, 2002).

Se conoce que algunos géneros de *Azospirillum* y *Azotobacter* penetran la corteza de la raíz y producen fitohormonas como giberelinas, auxinas (ácido indolacético), citocininas, ácido absísico y fijan N₂ (Vargas *et al.*, 2001), lo que estimula el crecimiento, la producción de raíces laterales y pelos radicales que, a su vez, favorecen la absorción de nutrientes (De Freitas & Germida., 1992) e incrementan el rendimiento en gramíneas (Bashan *et al.*, 1993.).

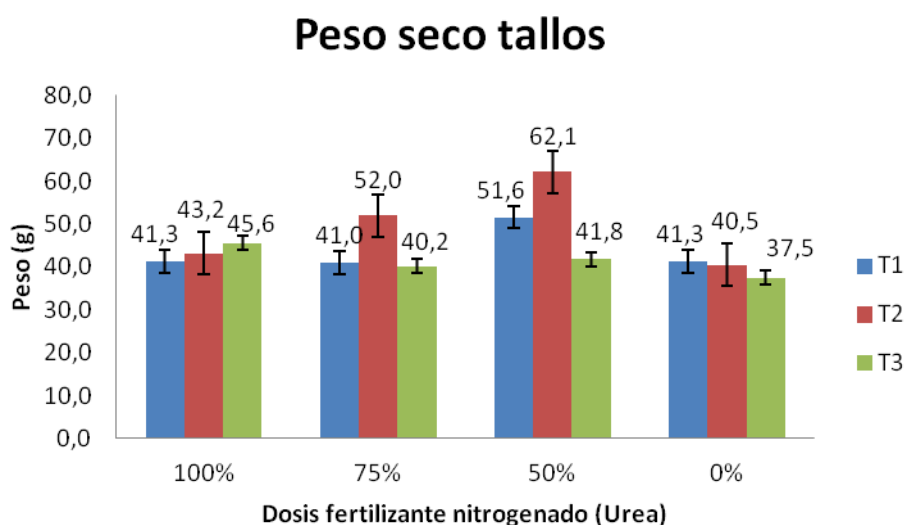


Figura 31. Peso seco tallos 90 días después de la siembra por tratamiento.

En la Figura 31, se observa que los pesos secos de los tallos presentan diferencias significativas con la dosis de urea, esto puede deberse que una alta concentración de nitrógeno es limitante para las bacterias y para la formación de nódulos y también inhiben el funcionamiento de la nitrogenasa. Estas bacterias secretan hormonas de crecimiento como giberelinas, auxinas y citoquininas (Aquilanti *et al.*, 2004) que con la fertilización nitrogenada en exceso pueden inhibirse (Avella, 2007).

Con la dosis de 75% de nitrógeno se observaron diferencias significativas ($p < .0001$) favoreciendo la bacteria dos (Anexo 10), lo que es consecuente con lo encontrado en las alturas a los 90 días después de la siembra. Observándose una diferencia de 11 gramos con respecto a la bacteria uno y 11.8 g con respecto al control. No hubo aumentos en peso para la bacteria uno y el control con respecto al tratamiento con el 100% de urea; sin embargo para la bacteria dos se presentó un aumento del 20.37%.

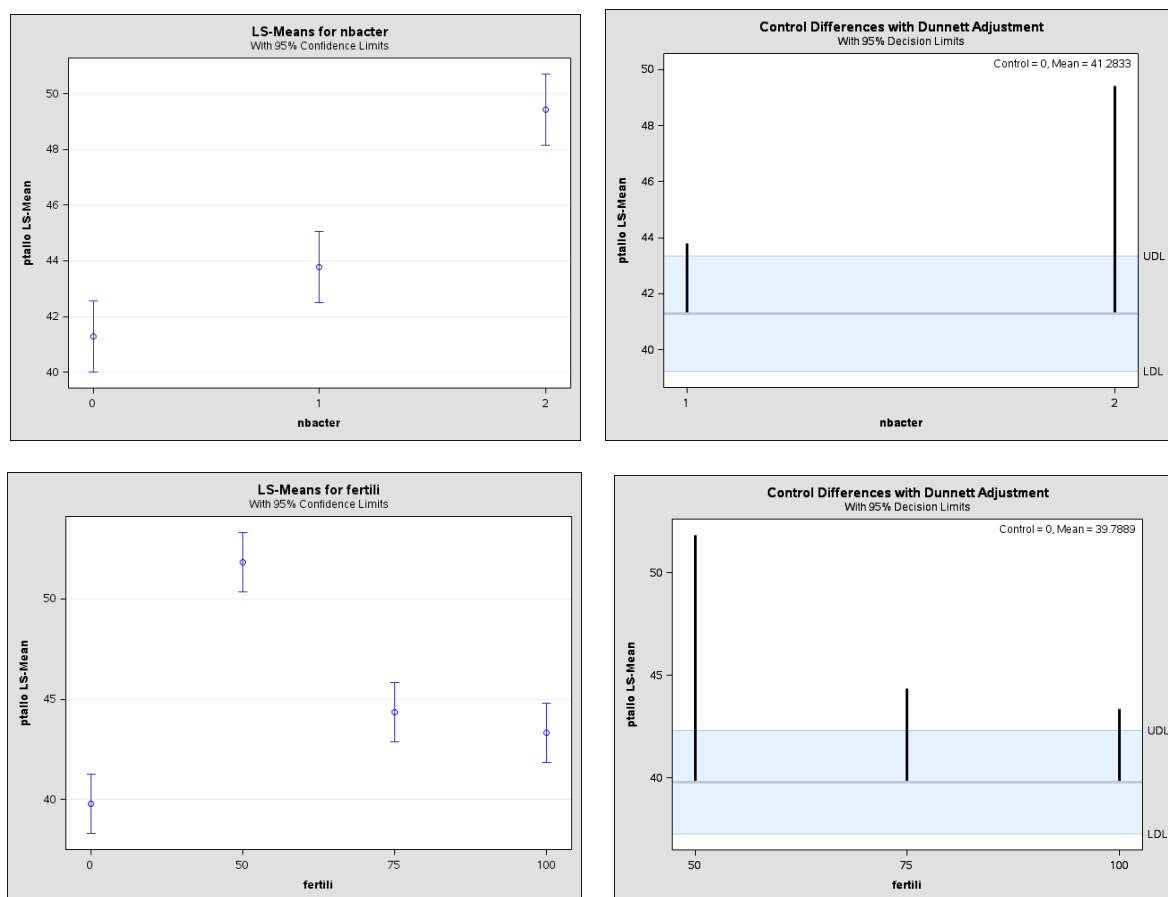


Figura 32. Diferencias significativas por tratamiento.

Con el 50% de urea se noto un incremento del 25.85% para la bacteria uno, 19.42% para la bacteria dos y solo 3.98% para el control. Finalmente sin adición de nitrógeno no se pudieron determinar diferencias significativas entre tratamientos (Figura 32).

Además *Azotobacter* sp. es capaz de producir sustancias fungistáticas que, al inhibir el crecimiento de los hongos fitopatógenos del suelo, promueven indirectamente el desarrollo de las plantas, específicamente en las etapas tempranas del cultivo. Estos compuestos tienen acción sobre hongos

pertenecientes al los géneros *Fusarium*, *Alternaria*, *Penicillium* y *Rhizoctonia* (Mayea et al., 1998, Rodelas, 2001).

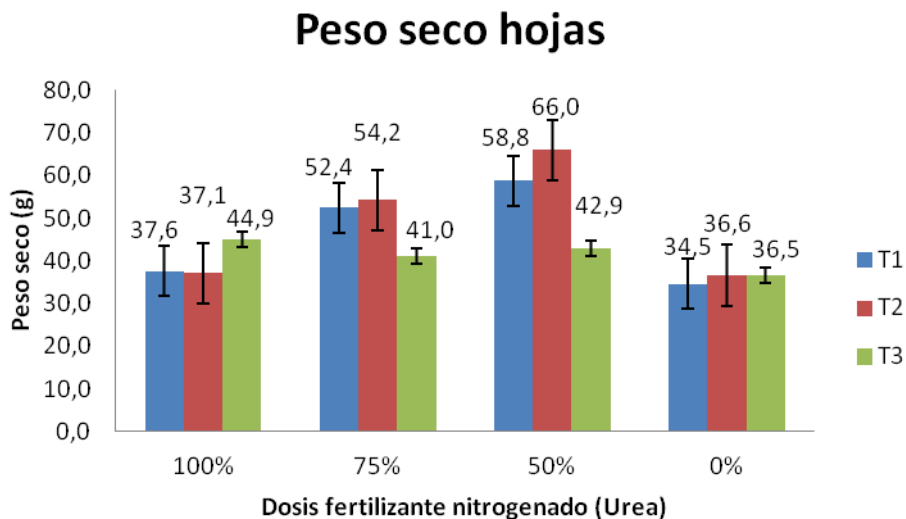


Figura 33. Peso Seco de las hojas 90 días después de la siembra por tratamiento.

En la Figura 33 se observan que los pesos secos de hojas después de 90 días, siguen manteniendo la misma tendencia de los pesos de raíces y tallos, similar a los resultados encontrados por (Kloepper et al., 1991) donde sostiene que el desarrollo de las raíces, mejorado por efecto de la inoculación de las bacterias, se revela directamente en mayor crecimiento de la parte aérea del cultivo; las bacterias promotoras de crecimiento, se caracterizan por incrementar el desarrollo radical, lo que repercute directamente en el rendimiento del cultivo.

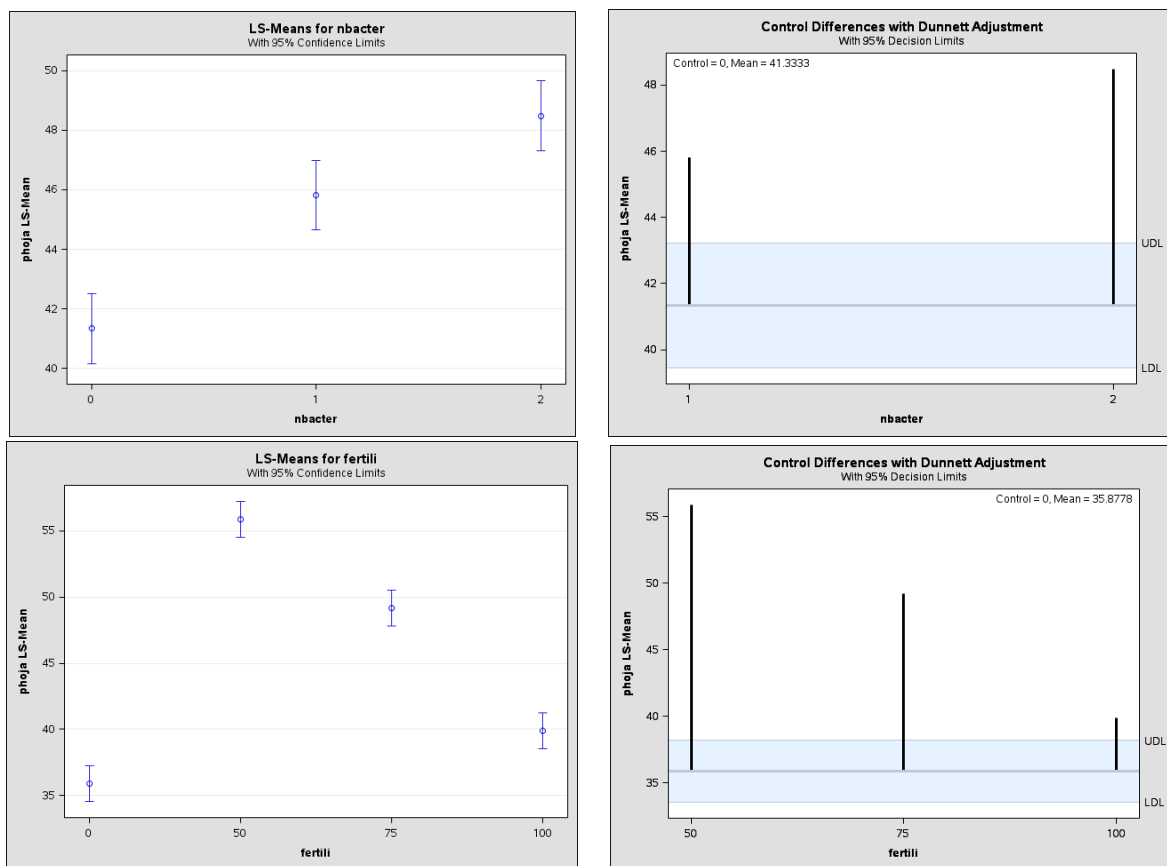


Figura 34. Diferencias significativas por tratamiento.

En el tratamiento con 100% de urea no se registraron diferencias significativas tras la adición de las bacterias (Anexo 11); pero en el tratamiento con el 75% de urea se nota un aumento del 39% para la bacteria uno y del 46.1% para la bacteria dos. Con el 50 % de la urea se incrementó el peso de las hojas en 12.21 y 21.77% para la bacteria uno y dos respectivamente, encontrándose diferencias significativas entre tratamientos favoreciendo a la bacteria dos. En el tratamiento sin adición de nitrógeno se encontraron diferencias significativas ($p < 0.0001$) con la adición de bacterias (Figura 34), lo que puede demostrar que no se deben prescindir del fertilizante debido a que este nutriente es importante también para iniciar los procesos metabólicos de los microorganismos y las plantas involucradas en esta asociación.

También se notó que las variables agronómicas evaluadas en la parte aérea y en la raíz del cultivo, se correlacionaron debido a que las bacterias promueven el crecimiento de raíces lo que conlleva a un aumento en la concentración de materia seca (Borda M. *et al.*, 2009); es importante anotar que la tasa de crecimiento de la caña se mide en términos de materia seca (MS) (Estévez *et al.*, 1995).

7.3.3 Nitrógeno foliar

Dos factores básicos que contribuyen a la complejidad de la respuesta de la planta a la inoculación con bacterias son: la variedad de la planta cultivada, ya que cada una responde distinto a la inoculación y el nivel de fertilización con nitrógeno (de Carvalho *et al.*, 2011). Los rendimientos más altos se han obtenido con niveles de fertilización de nitrógeno más bajos de lo normal (75% de la cantidad de fertilizante nitrogenado utilizado normalmente (Bashan *et al.*, 1996, Talulé *et al.*, 2011).

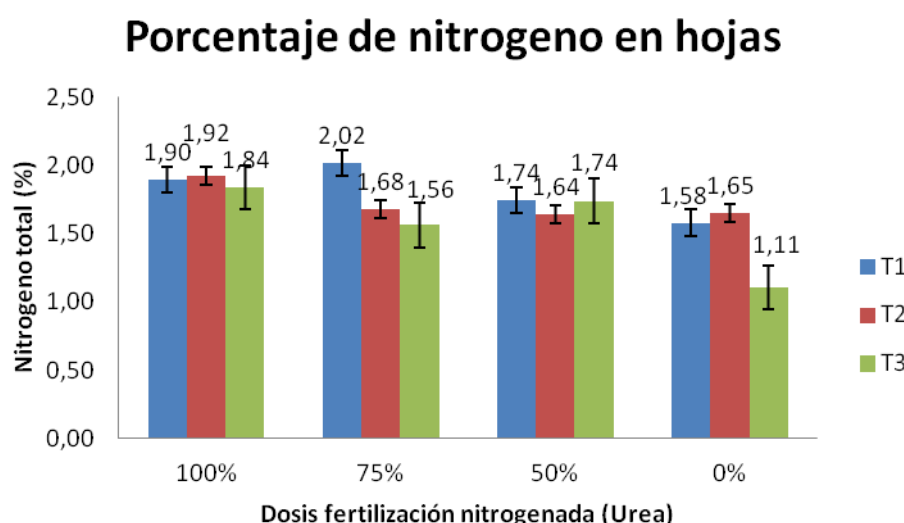


Figura 35. Porcentaje de nitrógeno en hojas 90 días después de la siembra por tratamiento.

Lo que se puede notar en Figura 35, donde el valor más alto de %N en hojas lo obtuvo la bacteria uno con 75% de la dosis; esto puede ser debido a que según (Rodríguez *et al.*, 2005); la actividad nitrogenasa es mayor en ausencia de nitrógeno, así como con la adición de KNO_3 .

Con la dosis no se observan diferencias significativas $p > 0.0256$ (Figura 36) (Anexo 12), con excepción del tratamiento con 100% y 0% que evidencio una diferencia significativa $p < 0.0034$; sin embargo, con el 75% de la dosis de fertilizante nitrogenado se nota una diferencia en el porcentaje de nitrógeno foliar de 0,46% para la bacteria dos y 0.12% para la bacteria uno. Con el 50% de la dosis de urea no se encuentran diferencias significativas entre tratamientos; lo que indica que se puede obtener los mismos niveles de nitrógeno en hojas con la mitad de la dosis de fertilizante químico (Boddey *et al.*, 2003).

Para el tratamiento sin fertilización se puede notar una disminución en los niveles de nitrógeno en hojas para el control, sin embargo para las bacterias uno y dos los niveles continúan manteniéndose, lo que demuestra el efecto de la fijación de nitrógeno en las plantas de caña de azúcar (Talulé *et al.*, 2011).

Para el nitrógeno, el suministro depende de factores de suelo y clima que afectan la mineralización de la materia orgánica del suelo y de los residuos de cosecha del ciclo anterior (Palma *et al.*, 2002). El suministro de nitrógeno no es adecuadamente medido mediante índices químicos, más bien es función de los residuos de cosecha y las raíces incorporadas, y del nitrógeno inmovilizado de la fertilización del ciclo anterior (Palma *et al.*, 2002) (Gallegos & Quispe, 2009).

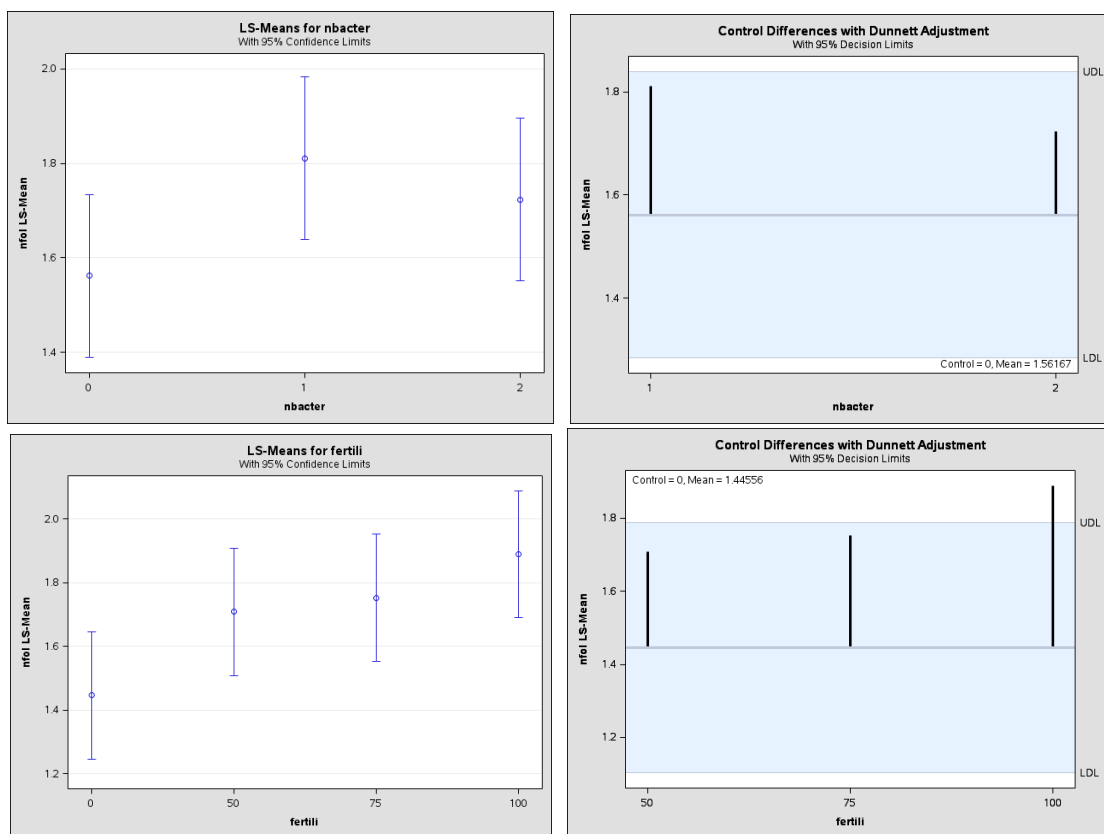


Figura 36. Diferencias significativas por tratamiento.

8 CONCLUSIONES

- Esta investigación permitió obtener cinco cepas nativas de un Mollisol, usando técnicas microbiológicas y bioquímicas tradicionales, con las cuales se probó su eficiencia experimentalmente en la producción de sustancias reguladoras de crecimiento, fijación de nitrógeno y resistencia a la vinaza. Esto demuestra la importancia de aplicar productos biológicos en beneficio de una agricultura sostenible.
- La cepa 19 y la cepa 4 presentan tiempos de generación cortos, resistencia a la vinaza con recuentos de $4.70E+05$ y $5.30E+05$, después de 9 horas de inoculación, altas producciones de AIA y otros compuestos indólicos con 0.90 y $0.98 \mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$, y capacidad de fijación de nitrógeno, lo que las convierte en microorganismos promisorios con características de interés para la producción de biofertilizantes.
- Con la aplicación de las bacterias en plantas de caña de azúcar se pudo determinar el beneficio promotor de crecimiento y la fijación de nitrógeno sobre el desarrollo de las plantas, específicamente usando la cepa 19 en combinación con el 50% de la dosis de fertilizante nitrogenado.
- Estos resultados corroboran el valor que tienen las bacterias de este género en procesos biológicos fundamentales como la fijación del nitrógeno y como consecuencia de ello la potencialidad para ser empleadas como biofertilizantes que pueden actuar como agentes reductores de urea en el cultivo de la caña de azúcar.

9 RECOMENDACIONES

- Es importante resaltar que en condiciones naturales, la competencia por los exudados entre los microorganismos es intensa. Por tanto se deben hacer investigaciones en condiciones naturales, con inoculación de poblaciones bacterianas altas que permitan que las bacterias del bioinóculo estén presentes en un mayor número de raíces vecinas y tengan mayor disponibilidad de exudados que aquéllas con baja densidad.
- También se deben promover ensayos en mezcla de bacterias autóctonas, dado que se ha comprobado que estos microorganismos benéficos actúan en sinergismo.
- Acompañar o complementar estos estudios con técnicas moleculares que permitan optimizar el estudio de las rutas metabólicas involucradas en el ciclo del nitrógeno y la identificación de las bacterias que participan en el proceso.

10 REFERENCIAS

- AGUERO M., A. M. (2009) Producción de bacterias fijadoras de nitrógeno (*Azotobacter*, *Bacillus* y *Pseudomonas*): En medio líquido a base de melaza para su aplicación en el cultivo de caña de azúcar (*Saccharum* spp) en azucarera el viejo, Guanacaste, Costa Rica. *Escuela de Biología. Instituto tecnológico de Costa Rica. Cartago* Tesis maestría en biología.
- ANDO, S., GOTO, M., MEUNCHANG, S., THONGRAECHAR, P., FUJIWARA, T., HAYASHI, H. & YONEYAMA, T. (2005) Detection of *nifH* sequences in sugarcane (*Saccharum officinarum* L.) and pineapple (*Ananas comosus* [L.] Merr.) *Soil Science & Plant Nutrition*, 51, pp 303-308.
- AQUILANTI, L., FAVILLI, F. & CLEMENTI, F. (2004) Comparison of different strategies for isolation and preliminary identification of *Azotobacter* from soil samples. *Soil Biology and Biochemistry*, 36, pp 1475-1483.
- ARREOLA, E., J., PALMA L., D., SALGADO G., S., CAMACHO C., W., OBRADOR-O., J., JUÁREZ L, J. & PASTRANA A., L. (2004) Evaluación de abono organomineral de cachaza en la producción y calidad de la caña de azúcar. *Terra Latinoamericana*, 22, pp 351-357.
- AVELLA, D. J. J. (2007) Caracterización molecular de cepas nativas colombianas de *Azotobacter* spp. mediante el análisis de restricción de DNA ribosomal 16S. *Pontificia Universidad Javeriana. Tesis pregrado Microbiología Industrial*, pp 41-47.
- BACA, B., SOTO, L. & PARDO, M. (2000) Fijación biológica de nitrógeno. *Elementos* 1: 39, pp 43- 49.
- BASHAN, Y., G. OLGUÍN, M. E., PUENTE, A., CARRILLO, L., ALCARAZ M., A., LÓPEZ-C. & OCHOA., J. L. (1993.) Critical evaluation of plant inoculation with beneficial from the genus *Azospirillum*. *R. Ferrera-Cerrato y R. Quintero L. (eds.). Agroecología, sostenibilidad y educación.*, Centro de Edafología, Colegio de Postgraduados. Montecillo, México., pp 115-126.
- BASHAN, Y., HOLGUIN, G. & FERRERA-C., R. (1996) Interacciones entre plantas y microorganismos benéficos. I. *Azospirillum*. *Terra*, 14, pp 159-194.
- BASHAN, Y. & LEVANONY, H. (1990) Current status of *Azospirillum* inoculation technology: *Azospirillum* as a challenge for agriculture. *Can. J. Microbiol*, 36, pp 591-608.
- BAUTISTA, L. X. C. & GALLARDO, I. R. (2008) Estandarización de métodos de detección para promotores de crecimiento vegetal (Ácido Indol Acético y Giberelinas) en cultivos microbianos. *Pontificia Universidad Javeriana*, Tesis.
- BODDEY, R. M., URQUIAGA, S., ALVES, B. J. R. & REIS, V. (2003) Endophytic nitrogen fixation in sugarcane: present knowledge and future applications. *Plant and soil*, 252, pp 139-149.
- BORDA M., D., PARDO-G., J. M., MARTÍNEZ-S., M. M. & MONTAÑA L., J. S. (2009) Producción de un biofertilizante a partir de un aislamiento de *Azotobacter nigricans* obtenido en un cultivo de *Stevia rebaudiana* Bert. *Universitas Scientiarum*, 14, pp 71-78.
- BRANDL, M., CLARK, E. M. & LINDOW, S. E. (1996) Characterization of the indole-3-acetic acid (IAA) biosynthetic pathway in an epiphytic strain of *Erwinia herbicola* and IAA production in vitro. *Canadian journal of microbiology*, 42, pp 586-592.
- BRENNER, D. J., KRIEG, N. R., GARRITY, G. M. & STALEY, J. T. (2005) Bergey's manual of systematic bacteriology: The proteobacteria. *Springer*, 2, 1338 p.
- CALDERÓN, H., ARANGO, J. S. & QUINTERO, J. M. (1997) Fertilización Nitrogenada al Fondo del Surco para el Establecimiento de Caña de Azúcar. IV Congreso Colombiano de la Asociación de Técnicos de la Caña de Azúcar. *INCAUCA S.A. TECNICAÑA Cali*, pp 255-266.

- CÁRDENAS, D. M., GARRIDO, M. F., BONILLA, R. R. & BALDANI, V. L. (2010) Aislamiento e identificación de cepas de *Azospirillum* sp. en pasto guinea (*Panicum maximum* Jacq.) del Valle del Cesar. *Pastos y Forrajes*, 33, p 1.
- CENICAÑA (2009) Procedimiento para el recuento de microorganismos en muestras de suelo. *Manual de protocolos laboratorio de fitopatología*.
- CONPES, D. (2009) Política nacional para la racionalización del componente de costos de producción asociado a los fertilizante en el sector agropecuario. *Consejo nacional de política económica y social república de Colombia departamento nacional de planeación*, 34 p.
- CORPOICA (2007) Aislamiento y caracterización de bacterias estimuladoras de crecimiento vegetal *Azotobacter* sp. *Portafolio de productos y servicios*. Consultado abril 2011, disponible en: <http://www.conalgodon.com/archivador/Bioinsumos.pdf>.
- CRACOGNA, M. F., IGLESIAS, M. C., FOGAR, M. N. & ROSSO, J. (2003) Presencia de *Beijerinckia* sp. y *Azotobacter* sp. en cañaverales del nordeste santafesino. *Universidad Nacional del Nordeste Comunicaciones Científicas y Tecnológicas Resumen A-046*, pp 1-4 Bogotá D.C.
- DE CARVALHO, T. L. G., FERREIRA, P. C. G. & HEMERLY, A. S. (2011) Sugarcane genetic controls involved in the association with beneficial endophytic nitrogen fixing bacteria. *Tropical Plant Biology*, 4, pp 31-41.
- DE FREITAS, J., R., & GERMIDA, J., J., (1992) Growth promotion of winter wheat by *Pseudomonas fluorescens* under growth chamber conditions. *Soil Biol. Biochem.*, 24, pp 1127-1135.
- DÖBEREINER, J., S., URQUIAGA, R., BODDEY, M. & AHMAD, N. (1995.) Alternatives for nitrogen of crops in tropical agriculture. Nitrogen economy in tropical soil. *Fertil. Res*, 42, pp 339-346.
- DOS REIS J., F. B., DA SILVA, L.G., MASSENA R., V., & DOBEREINER, J. (2000) Ocorrência de bacterias diazotróficas em diferentes genótipos de cana-de-açúcar. *Pesq. Agropecuaria Bras.*, 35, pp 985-994.
- ECHEVERRÍA, D. L. B. M. & KOCH, A. (2007) Producción de biofertilizante a partir de cepas autóctonas de *Azotobacter* SPP mediante fermentación discontinua en caldo pikovskaya modificado y caldo alternativo a escala de diez litros. *Tesis pregrado Ingeniería en biotecnología*, Sangolquí/espe Ecuador.
- ESTÉVEZ, A. A., COCK, J. H., HERNÁNDEZ P., A. & IRVINE, J. E. (1995) Morfología de la Caña de Azúcar. *El cultivo de la caña en la zona azucarera de Colombia* CENICAÑA, pp 31-62.
- FISCHER, D., PFITZNER, B., SCHMID, M., SIMOES-ARAÚJO, J. L., REIS, V. M., PEREIRA, W., ORMEÑO-ORRILLO, E., HAI, B., HOFMANN, A., SCHLOTER, M., MARTINEZ-ROMERO, E., BALDANI, J. I. & HARTMANN, A. (2011) Molecular characterisation of the diazotrophic bacterial community in uninoculated and inoculated field-grown sugarcane (*Saccharum* sp). *Plant Soil*.
- FUENTES - RAMÍREZ, L. E., CABALLERO- MELLADO, J., SEPÚLVEDA, J. & MARTÍNEZ- ROMERO, E. (1999) Colonization of sugarcane by *Acetobacter diazotrophicus* is inhibited by high fertilization. *FEMS Microbiology Ecology*, 29, pp 117-128.
- FUENTES R., L. E., JIMÉNEZ S., T., ABARCA O., I. R. & CABALLERO M., J. (1993) *Acetobacter diazotrophicus*, and indolacetic acid producing bacterium isolated from sugarcane cultivars of Mexico. *Plant Soil*, 154, pp 145-150.
- GAITÁN, I., GARCÍA, E. (1998) Prueba a nivel de campo y escalado a planta piloto del proceso de producción de biofertilizante. *Universidad Nacional de Ingeniería*, Managua, Nicaragua.
- GALLEGOS, M. A. R. & QUISPE, J. L. (2009) Capacidad promotora de crecimiento vegetal por bacterias del género *Azotobacter* y Actinomicetos aislados de cultivos de *Solanum*

- tuberosum* Linnaeus, 1753 (Papa) cultivados en zonas altoandinas del Perú. *Tesis de pregrado biólogo con mención en biología celular y genética*.
- GARCÍA, S. S., ESCOBAR, R. N. & ALANIS, L. B. (2003) Determinación de la dosis óptima económica de fertilización en caña de azúcar. *Terra*, 21 p.
- GARZON, S., LAMPREA, S. & MARTINEZ, M. (2001) Sucrochemical industry wastes as biofertilizer substrates. *Environmental and Industrial Biotechnology Group*, Pontificia Universidad Javeriana, pp 1- 7.
- GAVIRIA GIRALDO, J. (2011) Evaluación de diferentes metodologías para el aislamiento de la bacteria endófito *Gluconacetobacter* ssp. a partir de cultivos de caña de azúcar provenientes del municipio de Supía (Caldas). *Tesis Manizales*, Universidad Católica de Manizales.
- GIRALDO, J. C. (1974) Caña de azúcar: producción de semilla vegetativa. *Instituto Colombiano Agropecuario - Curso sobre producción y tecnología de semillas* Medellín - Colombia pp 84-81
- GÓMEZ, J. F. & SÁNCHEZ, O. (1968) Fertilización nitrogenada en caña de azúcar. *Revista ICA (Colombia)*, 3:4, pp 357-368.
- GÓMEZ, M. P. (2008) Influencia de la aplicación de vinaza sobre la presencia, actividad y biomasa microbiana del suelo en el cultivo de maíz dulce (*Zea mays*). *Tesis de Magister en Ciencias Agrarias Enfasis Suelos* Universidad Nacional de Colombia, Palmira
- GONZALES, M. S. & BARRAQUIO, W. L. (2000) Isolation and characterization of *Acetobacter diazotrophicus* (Gillis) in *Saccharum officinarum* L., *S. spontaneum* L., and *Erianthus* sp. *Philippine Agricultural Scientist*, 83.
- INFORME ANUAL CENICAÑA (2012). *Centro de Investigación de la Caña de Azúcar (CENICAÑA)*, Cali, CENICAÑA, 132 p
- ITZLGSHN, R., S.BURDMAN, Y. OKON, E. ZAADAY, R. YONATAN & PEREVOLOTSKY (2000) Plant-growth promotion in natural pastures by inoculation with *Azospirillum brasilense* under suboptimal growth conditions. *Arid Soil Res. Rehab*, 13, pp 151-158.
- KLOEPPER, J. W., ZABLOTOWICZ, R. M., TIPPING, E. M. & R., L. (1991) Plant growth promotion mediated by bacterial rhizosphere colonizer. *D.L. Keister y P.B. Cregan (eds.). The rhizosphere and plant growth.*, Kluwer. Dordrecht, The Netherlands., pp 315-326.
- KORNDOFER, N. A., WALDO, A. & LARA, C. (2004) Impacto ambiental del uso de la vinaza en la agricultura y su influencia en las características químicas y físicas del suelo. *Encuentro sobre vinazas, potasio y elementos menores para una agricultura sostenible*, Corpoica 233 p.
- LEE, S., FLORES-ENCARNACION, M., CONTRERAS-ZENTELLA, M., GARCIAFLORES, L. & ESCAMILLA, J. E. K., C. (2004) Indole-3-acetic acid biosynthesis is deficient in *Gluconacetobacter diazotrophicus* strains with mutations in cytochrome c biogenesis genes. *J. Bacteriol.*, 186:16, pp 5384-5391.
- LEMANCEAU, P., CORBERAND, T., GARDAN, L., LATOUR, X., LAGUERRE, G., BOEUFFRAS, J. & ALABOUVETTE, C. (1995) Effect of two plant species, flax (*Linum usitatissimum* L.) and tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) on the diversity of soil-borne populations of fluorescent pseudomonads. *Appl. Environ. Microbiol.*, 61, pp 10004-1012.
- LOREDO, O., C., LÓPEZ-REDES, L. & ESPINOSA-VICTORIA, D. (2004) Bacterias promotoras del crecimiento vegetal asociadas con gramíneas: Una revisión. *Terra Latinoamericana*, 22, pp 225-239.
- LOZANO, L. A. C., REYES, E. A. M., TORRES, G. A. B. & VILLEGAS, L. H. (2005) Avances en la respuesta del cultivo de caña de azúcar a la biofertilización con bacterias fijadoras de

- nitrógeno y hongos solubilizadores de fósforo, Riopaila-Castilla S.A Valle del Cauca Colombia.
- MAYEA, S., CAROME, M., NOVO, R., BOADO, I., SILVERIRA, E., SORIA, M., MORALES, Y. & VALIÑO, A. (1998) Microbiología Agropecuaria. *Tomo II*, La Habana: Ed. Félix Varela., pp 34-36.
- MOORE E., ARNSCHEIDT A., KRUGER A., STROMPL C. & MAU M. (2004) Simplified protocols for the preparation of genomic DNA from bacterial cultures. *Molecular Microbial Ecology Manual, Second Edition* 1.01, Kluwer Academic Publishers - Printed in the Netherlands pp 3-18.
- OBANDO, M., BURGOS, L., RIVERA, D., GARRIDO, M., BALDANI, V. & BONILLA, R. (2010) Caracterización de bacterias diazotróficas asimbióticas asociadas al eucalipto (*Eucalyptus* sp.) en Codazzi, Cesar (Colombia). *Acta biol. Colomb*, 15, pp 105-118.
- OKON, Y. & LABANDERA, C. A. (1994) Agronomic applications of *Azospirillum*: an evaluation of 20 years worldwide field inoculation. *Soil Biol. Biochem.*, 26, pp 1591-1601.
- OROZCO J., C. & MARTÍNEZ N., P. (2009) Evaluación de la inoculación con microorganismos fijadores de nitrógeno asimbióticos aislados de la rizósfera de *Pinus patula* en Colombia. *Bosque (Valdivia)*, 30, pp 70-77.
- OTERO, J. V. (2011) Aislamiento, Selección e identificación de Actinomicetos, Bacterias Fotosintéticas No sulfurosas y Bacterias Ácido Lácticas con Potencial Biofertilizante, a Partir de Suelos Asociados al Cultivo de Plátano en la Costa Atlántica Colombiana. *Universidad Nacional de Colombia Tesis Maestría* pp 67-74.
- PALMA, A., GIL, N. & CORTÉS, E. (2010) Producción de caña y azúcar en el valle del río Cauca entre enero y septiembre de 2010. *Centro de Investigación de la Caña de Azúcar (CENICAÑA)*.
- PALMA, L. D. J., SALGADO G., S., OBRADOR O., J. J., TRUJILLO N., A., LAGUNES E., L. C., ZAVALA C., J., RUIZ B., A. & CARRERA M., M. A. (2002) Sistema integrado para recomendar dosis de fertilización en caña de azúcar (SIRDF). *Terra*, 20, pp 347-358.
- PARRA, M. G. (2000) Efecto de un inoculante microbiano a partir de cepas nativas de *Azotobacter chroococcum* sobre el rendimiento en secuencias de cultivos hortícolas. *Universidad de Camaguey*, Tesis.
- PÉREZ, O., UFER, C., AZAÑÓN, V. & SOLARES, E. (2008) Estrategias para la optimización del uso de fertilizantes nitrogenados en el cultivo de Caña de Azúcar en Guatemala. *CENGICAÑA, Corporación pantaleón, Ingenio la unión, ingenio Magdalena.*, pp 159-166.
- QUINTERO, D., R., GARCÍA SÁNCHEZ, A., CORTÉS LOMBANA, A., MUÑOZ ARBOLEDA, F., TORRES AGUAS, J. S., CARBONELL GONZÁLEZ, J. A. & OSORIO MORILLO, C. A. (2008) Grupos homogéneos de suelos del área dedicada al cultivo de la caña de azúcar en el valle del Río Cauca (segunda aproximación). Cali, Cenicaña. *Serie técnica No. 37*, 112 p.
- QUINTERO, D. R. (1997) Fertilización nitrogenada en caña de azúcar. Cenicaña, Cali – Colombia, Serie Técnica.
- RAMOS, G. (2005) Caña de azúcar en Colombia. *Revista de Indias ASOCAÑA* 65, pp 49-78.
- RENGEL, M., GIL, F. & MONTAÑO, J. (2011) Crecimiento y dinámica de acumulación de nutrientes en caña de azúcar. Macronutrientes. *Bioagro*, 21, pp 43-50.
- RESENDE, A. S. D., XAVIER, R. P., OLIVEIRA, O. C. D., URQUIAGA, S., ALVES, B. J. R. & BODDEY, R. M. (2006) Long-term effects of pre- harvest burning and nitrogen and vinasse applications on yield of sugar cane and soil carbon and nitrogen stocks on a plantation in Pernambuco. *In Plant and Soil*, 281, pp 337-349.
- REVELO, C. F., BARRERO, V. M. & ESCOBAR, C. A. (1994) Estudio de Detallado de Suelos. *Corporacion Autonoma Regional de Cauca (CVC), Cali, Colombia*.
- REYES, I. & VALERY, A. (2007) Efecto de la fertilidad del suelo sobre la microbiota y la promoción del crecimiento Del maíz (*zea mays* L.) Con *Azotobacter* spp. *Bioagro*, 19, pp 117-126.

- RIVES, N., ACEBO, Y. & HERNÁNDEZ, A. (2007) Reseña bibliográfica "Bacterias promotoras del crecimiento vegetal en el cultivo del arroz (*Oryza sativa* L.). Perspectivas de su uso en Cuba". *Cultivos Tropicales*, 28, pp 29-38.
- RODELAS, M. (2001) Interacción *Rhizobium*- *Azospirillum* y *Rhizobium*- *Azotobacter*. Efecto sobre la nodulación y fijación simbiótica del dinitrógeno. *Vicia faba*. Consultado mayo 2012, Disponible en: <http://193.146.205.198/sefin/Ecological/Rodelas.html>.
- RODRÍGUEZ C., A. J., TRUJILLO C., I. D. & BRINGAS, Y. F. (2005) Caracterización fisiológica de la comunidad microbiana endófito de la caña de azúcar. *Revista Colombiana de Biotecnología*, 7, pp 66-75.
- RODRÍGUEZ, G. G. (2001) La genética y el mejoramiento de la caña de azúcar. Estado del arte. *Universidad de la Habana, Cátedra Azucarera* pp 1-14.
- ROJAS., S. R. & MORENO., S. N. (2008) Producción y formulación de prototipos de un biofertilizante a partir de bacterias nativas asociadas al cultivo de arroz (*Oryza sativa*). *Revista Colombiana de Biotecnología*, 10, pp 50-62.
- SALAZAR, S. E. (2003) CAPITULO IX. *Abonos Orgánicos y Plasticultura*, Facultad de Agricultura y Zootecnia de la UJED, Sociedad Mexicana de la Ciencia del Suelo, COC y TED, 233 p.
- SCHOEBITZ, M. I. (2006) Aislamiento y caracterización de bacterias promotoras de crecimiento vegetal de la rizosfera de *Lolium perenne* L. de suelo volcánico (modelo genero *Azospirillum* spp.). *Tesis Magister en Ciencias Agrarias*. Chile
- SOTO-URZUA, L. & BACA, B. E. (2001) Mecanismos de Protección de la Nitrogenasa a la Inactivación por Oxígeno. *Revista latinoamericana de microbiología - México.*, 43, pp 37-50.
- SUBIROS, F. (1998) Respuesta de la Cana de Azúcar (*Saccharum officinarum*) a la Fertilización con Nitrato de Amonio en un Molisol, Guanacaste. *Agronomía Costarricense* 13(1), pp 1-10.
- SUBIROS, J. F. & BERTSCH, F. (1998) Utilización de fertilizantes líquidos nitrogenados en tres ciclos de producción comercial de caña de azúcar en Guanacaste. *Agronomía Costarricense.*, 22, pp 89-98.
- TALULÉ, C., MAREQUE, C., BARLOCCO, C., HACKEMBRUCH, F., REIS, V. M., SICARDI, M. & BATTISTONI, F. (2011) The contribution of nitrogen fixation to sugarcane (*Saccharum officinarum* L.), and the identification and characterization of part of the associated diazotrophic bacterial community. *Plant Soil*.
- TEJERA, N., LLUCH, C., MARTINEZ T., M. V. & GONZALEZ L., J. (2005) Isolation and characterization of *Azotobacter* and *Azospirillum* strains from the sugarcane rhizosphere. *Plant and soil*, 270, pp 223-232.
- THAWEENUT, N., HACHISUKA, Y., ANDO, S., YANAGISAWA, S. & YONEYAMA, T. (2011) Two seasons` study on *nifH* gene expression and nitrogen fixation by diazotrophic endophytes in sugarcane (*Saccharum* spp. hybrids): expression of *nifH* genes similar to those of rhizobia. *Plant and soil*, pp 435:449.
- TORRES R., M. G., VALENCIA P., S. A., BERNAL C., J. & MARTINEZ N., P. (2000) Isolation of Enterobacteria, *Azotobacter* sp. and *Pseudomonas* sp., producers of indole-3-acetic acid and siderophores, from Colombian rice rhizosphere. *Revista Latinoamericana de Microbiología*, 42, pp 171-176.
- TORRIENTE, D. (2010) Revisión bibliográfica Aplicación de bacterias promotoras del crecimiento vegetal en el cultivo de la caña de azúcar. Perspectivas de su uso en cuba. *Cultivos Tropicales*, 31, pp 19-26.
- VARGAS, P. D., FERRERA C., R., ALMARAZ S., J. J. & GONZÁLEZ, G. A. (2001) Inoculación de bacterias promotoras de crecimiento en lechuga. *Terra*, 19 p.

- WAYNE, W. D. (1993) Bioestadística. *Base para el análisis de las ciencias de la salud. Tercera edición. Limusa. Noriega editores*, 676 p.
- WIEDENFELD, R. P. (1997) Sugarcane responses to N fertilizer application on clay soils. *J. Amer.Soc. Sugar Cane Technol.* , 17, pp 14- 27.

11 ANEXOS

ANEXO 1. MEDIO AGAR ASHBY (POR COMPONENTES).

COMPOSICIÓN	g/L
Sacarosa/Manitol o Benzoato	5
KH ₂ PO ₄	1
MgSO ₄ . 7H ₂ O	0,2
FeSO ₄ . 7H ₂ O	0,005
NaCl	0,2
CaCl ₂ . 2H ₂ O	0,2
Agar	15

pH 7.0 (+/- 0.2) Fuente : Avella, 2007

ANEXO 2. CALDO NUTRITIVO MERCK ®.

COMPOSICIÓN	g/L
Extracto de carne	3,0
Extracto de peptona	5,0

pH 7.0 (+/- 0.2) Fuente : Avella, 2007

ANEXO 3. PREPARACIÓN DE AZÚCARES MERCK ®.

COMPOSICIÓN	g/L
Base rojo fenol caldo	15
Azúcar (Maltosa, Manitol, Glucosa, Ramnosa)*	1

*para la preparación del Benzoato se agrega 1g/L de medio Fuente: Avella, 2007

ANEXO 4. PRUEBA DE OXIDASA Y CATALASA.

Prueba Oxidasa: Coloque sobre una tira de papel filtro varias gotas del reactivo de tetrametil p-fenilendiamina al 1% en agua destilada estéril con un palillo tome una colonia del microorganismo y frótela sobre el papel húmedo. Una prueba positiva de oxidasas se determina por el cambio de color azul a púrpura después de diez segundos de poner al microorganismo con el reactivo.

Prueba catalasa: Esta se lleva a cabo con el fin de comprobar la presencia de la enzima catalasa. Se toma con un asa una colonia pura de 18 a 24 h de incubación y se extiende sobre un portaobjetos,

posteriormente se agrega una gota de HO_2 al 3%. La formación de burbujas indica la liberación de O_2 característico de un resultado positivo (Avella, 2007).

ANEXO 5. CALDO TRIPTICASA SOYA (TSB) MERCK®.

COMPOSICIÓN	g/L
Glucosa	2,5
Peptona de caseína	17
Peptona de soya	3
NaCl	5
K_2HPO_4	2,5

Fuente: Bautista, 2008

ANEXO 6. REACTIVO DE SALKOWSKY.

COMPOSICIÓN	
FeCl_3	40mM
H_2SO_4	7,9mM

Con un volumen de reacción de 1ml AIA/ 2ml del reactivo de Salkowsky Fuente: Bautista, 2008

ANEXO 7. CALDO TRIPTÓFANO.

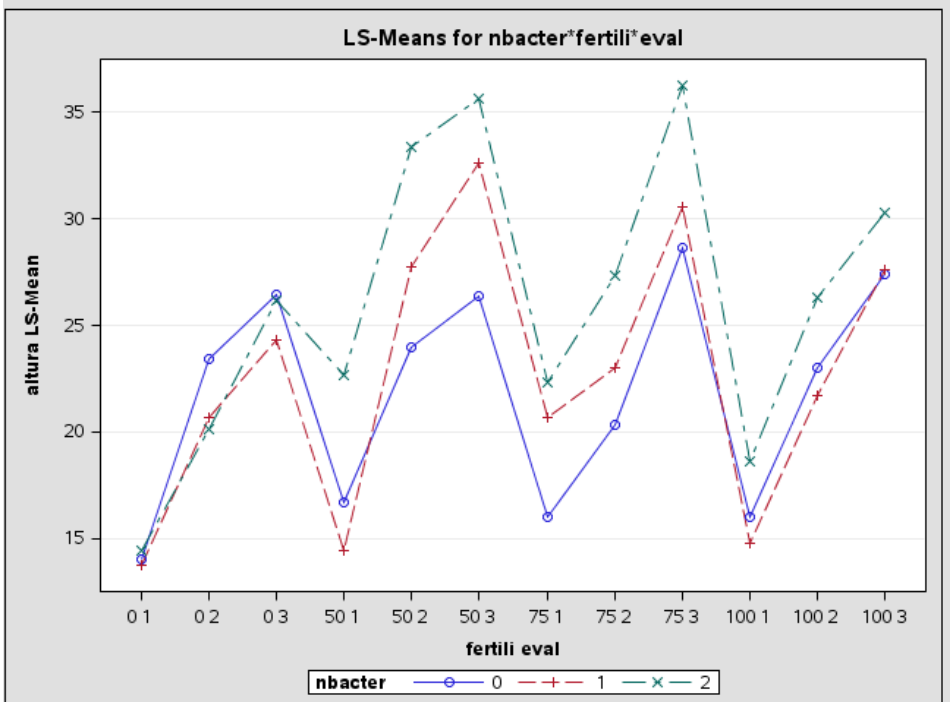
COMPOSICIÓN	g/L
Peptona de caseína	5
NaCl	5
Extracto de levadura	3
Extracto de carne	1
L-triptófano	2

Fuente: Torres – Rubio et al., 2000

ANEXO 8. ANOVA PARA ALTURA DE BROTES.

nbacter	fertili	eval	Estimador	Error estándar	DF	Valor t	Pr > t
0	0	1	14.0333	1.3984	65.6	10.04	<.0001
0	0	2	23.4000	1.3984	65.6	16.73	<.0001
0	0	3	26.4333	1.3984	65.6	18.90	<.0001
0	50	1	16.6667	1.3984	65.6	11.92	<.0001
0	50	2	24.0000	1.3984	65.6	17.16	<.0001
0	50	3	26.3667	1.3984	65.6	18.86	<.0001
0	75	1	16.0000	1.3984	65.6	11.44	<.0001
0	75	2	20.3333	1.3984	65.6	14.54	<.0001
0	75	3	28.6333	1.3984	65.6	20.48	<.0001
0	100	1	16.0000	1.3984	65.6	11.44	<.0001
0	100	2	23.0333	1.3984	65.6	16.47	<.0001
0	100	3	27.4333	1.3984	65.6	19.62	<.0001
1	0	1	13.7333	1.3984	65.6	9.82	<.0001
1	0	2	20.7000	1.3984	65.6	14.80	<.0001
1	0	3	24.3333	1.3984	65.6	17.40	<.0001
1	50	1	14.4000	1.3984	65.6	10.30	<.0001
1	50	2	27.7667	1.3984	65.6	19.86	<.0001

nbacter*fertili*evalMedias de mínimos cuadrados							
nbacter	fertili	eval	Estimador	Error estándar	DF	Valor t	Pr > t
1	50	3	32.6333	1.3984	65.6	23.34	<.0001
1	75	1	20.6667	1.3984	65.6	14.78	<.0001
1	75	2	23.0000	1.3984	65.6	16.45	<.0001
1	75	3	30.5667	1.3984	65.6	21.86	<.0001
1	100	1	14.8000	1.3984	65.6	10.58	<.0001
1	100	2	21.7000	1.3984	65.6	15.52	<.0001
1	100	3	27.6333	1.3984	65.6	19.76	<.0001
2	0	1	14.4667	1.3984	65.6	10.35	<.0001
2	0	2	20.1333	1.3984	65.6	14.40	<.0001
2	0	3	26.2000	1.3984	65.6	18.74	<.0001
2	50	1	22.6667	1.3984	65.6	16.21	<.0001
2	50	2	33.3667	1.3984	65.6	23.86	<.0001
2	50	3	35.6667	1.3984	65.6	25.51	<.0001
2	75	1	22.3000	1.3984	65.6	15.95	<.0001
2	75	2	27.3333	1.3984	65.6	19.55	<.0001
2	75	3	36.2667	1.3984	65.6	25.94	<.0001
2	100	1	18.6000	1.3984	65.6	13.30	<.0001
2	100	2	26.3333	1.3984	65.6	18.83	<.0001
2	100	3	30.3000	1.3984	65.6	21.67	<.0001

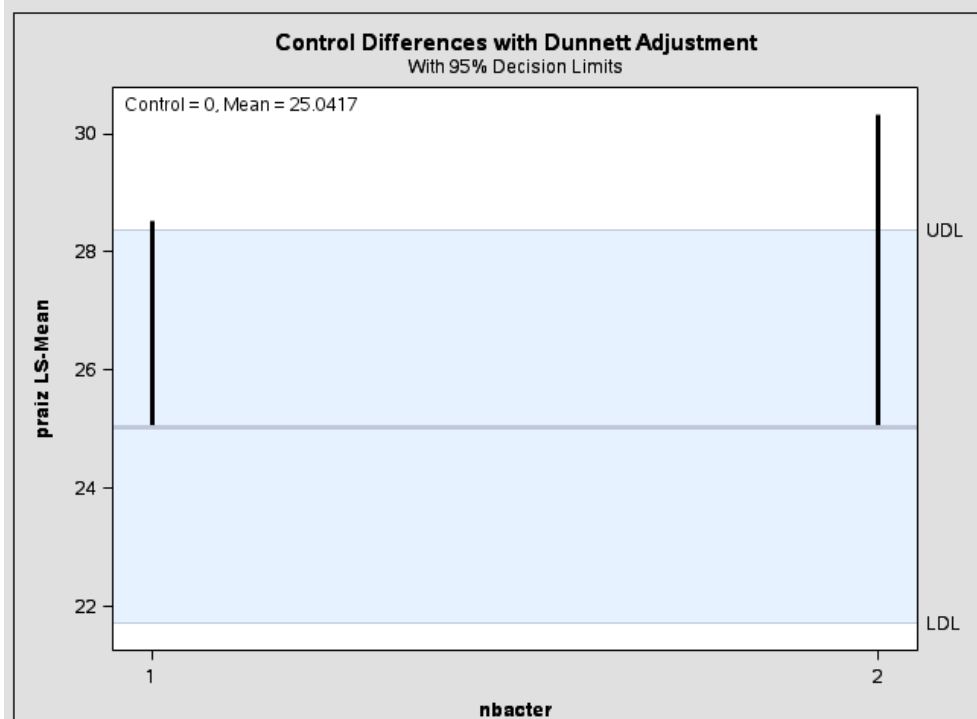


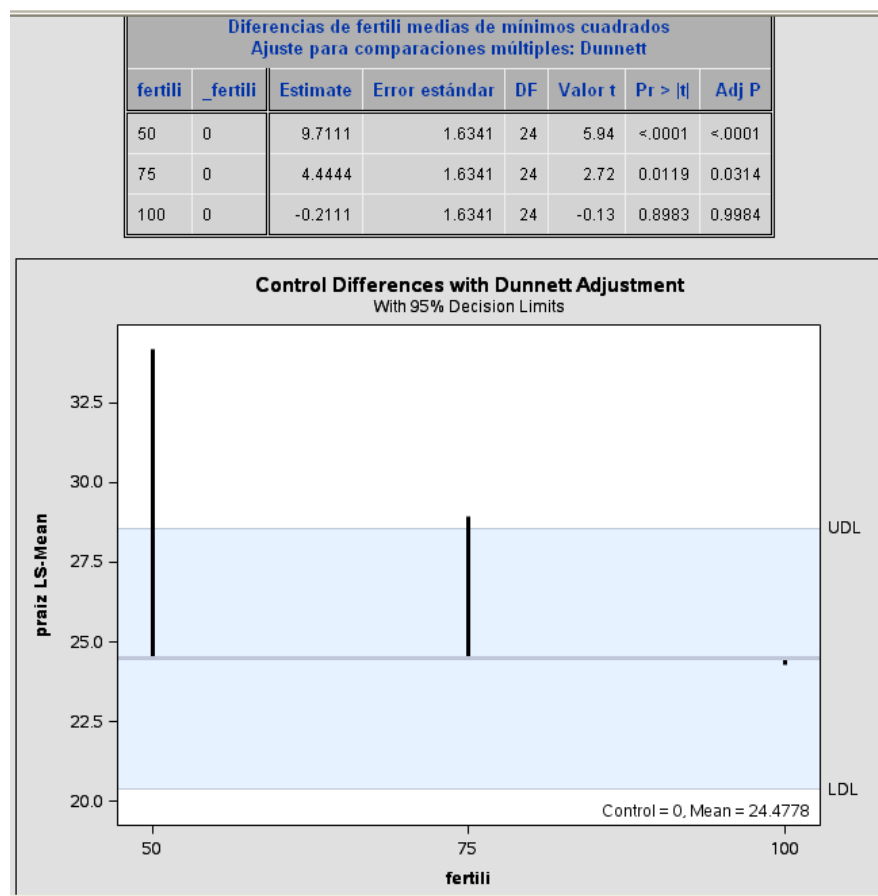
ANEXO 9. ANOVA PARA PESO DE RAICES.

Tipo III Tests de efectos fijos				
Efecto	Num DF	Den DF	F-Valor	Pr > F
nbacter	2	24	7.21	0.0035
fertili	3	24	16.35	<.0001
nbacter*fertili	6	24	2.77	0.0341

nbacterMedias de mínimos cuadrados					
nbacter	Estimador	Error estándar	DF	Valor t	Pr > t
0	25.0417	1.0006	24	25.03	<.0001
1	28.5250	1.0006	24	28.51	<.0001
2	30.3250	1.0006	24	30.31	<.0001

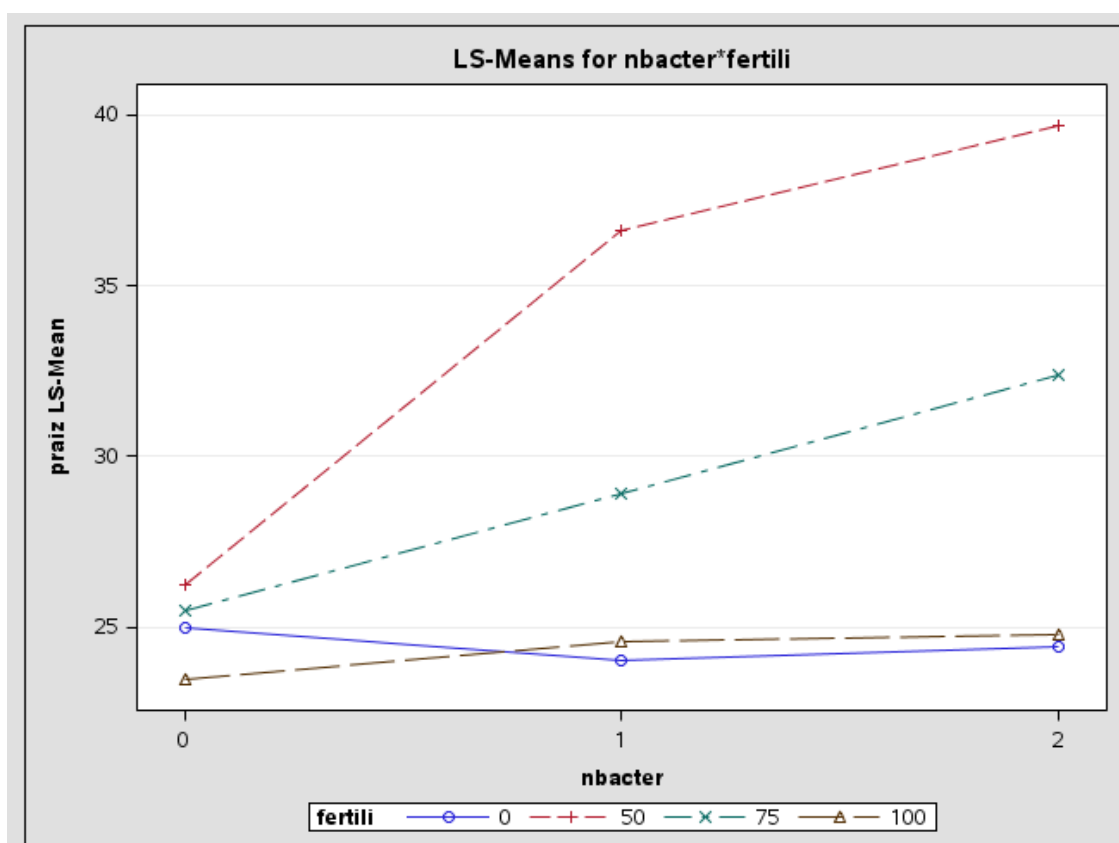
Diferencias de nbacter medias de mínimos cuadrados Ajuste para comparaciones múltiples: Dunnett							
nbacter	_nbacter	Estimate	Error estándar	DF	Valor t	Pr > t	Adj P
1	0	3.4833	1.4151	24	2.46	0.0214	0.0394
2	0	5.2833	1.4151	24	3.73	0.0010	0.0020





Diferencias de fertili medias de minimos cuadrados									
fertili	_fertili	Estimate	Error estándar	DF	Valor t	Pr > t	Alpha	Inferior	Superior
0	50	-9.7111	1.6341	24	-5.94	<.0001	0.05	-13.0836	-6.3386
0	75	-4.4444	1.6341	24	-2.72	0.0119	0.05	-7.8170	-1.0719
0	100	0.2111	1.6341	24	0.13	0.8983	0.05	-3.1614	3.5836
50	75	5.2667	1.6341	24	3.22	0.0036	0.05	1.8942	8.6392
50	100	9.9222	1.6341	24	6.07	<.0001	0.05	6.5497	13.2947
75	100	4.6556	1.6341	24	2.85	0.0089	0.05	1.2830	8.0281

nbacter*fertiliMedias de mínimos cuadrados						
nbacter	fertili	Estimador	Error estándar	DF	Valor t	Pr > t
0	0	24.9667	2.0013	24	12.48	<.0001
0	50	26.2667	2.0013	24	13.12	<.0001
0	75	25.4667	2.0013	24	12.73	<.0001
0	100	23.4667	2.0013	24	11.73	<.0001
1	0	24.0333	2.0013	24	12.01	<.0001
1	50	36.6000	2.0013	24	18.29	<.0001
1	75	28.9000	2.0013	24	14.44	<.0001
1	100	24.5667	2.0013	24	12.28	<.0001
2	0	24.4333	2.0013	24	12.21	<.0001
2	50	39.7000	2.0013	24	19.84	<.0001
2	75	32.4000	2.0013	24	16.19	<.0001
2	100	24.7667	2.0013	24	12.38	<.0001

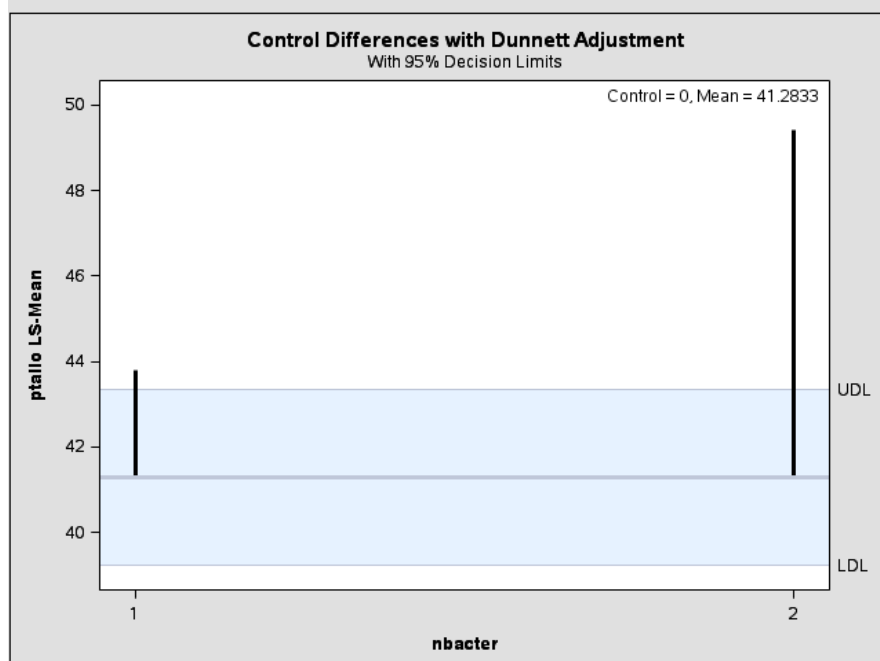


ANEXO 10. ANOVA PARA PESO DE TALLOS.

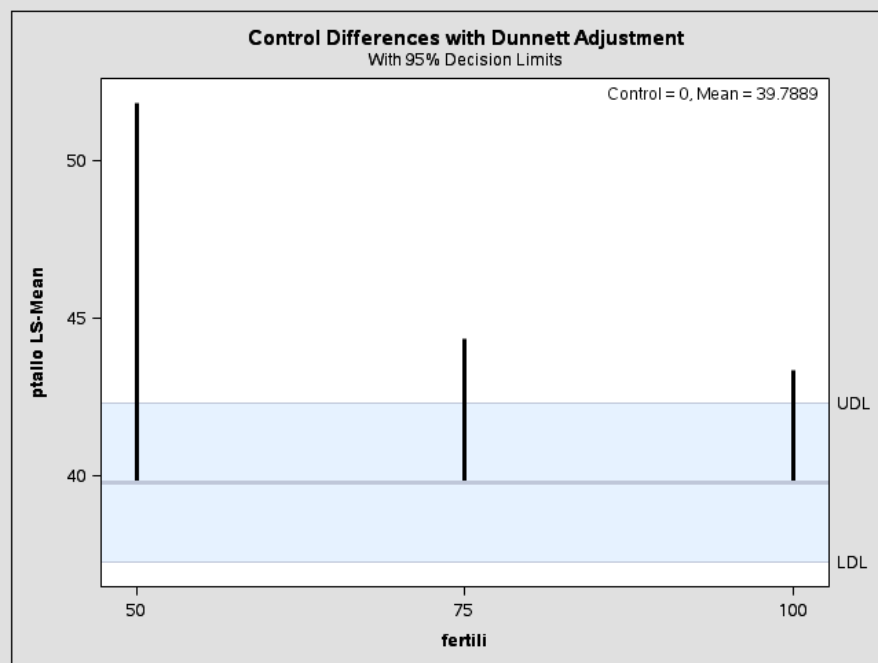
Tipo III Tests de efectos fijos				
Efecto	Num DF	Den DF	F-Valor	Pr > F
nbacter	2	24	45.53	<.0001
fertili	3	24	50.20	<.0001
nbacter*fertili	6	24	18.54	<.0001

nbacterMedias de mínimos cuadrados					
nbacter	Estimador	Error estándar	DF	Valor t	Pr > t
0	41.2833	0.6187	24	66.72	<.0001
1	43.7833	0.6187	24	70.76	<.0001
2	49.4333	0.6187	24	79.89	<.0001

Diferencias de nbacter medias de mínimos cuadrados Ajuste para comparaciones múltiples: Dunnett							
nbacter	_nbacter	Estimate	Error estándar	DF	Valor t	Pr > t	Adj P
1	0	2.5000	0.8750	24	2.86	0.0087	0.0163
2	0	8.1500	0.8750	24	9.31	<.0001	<.0001

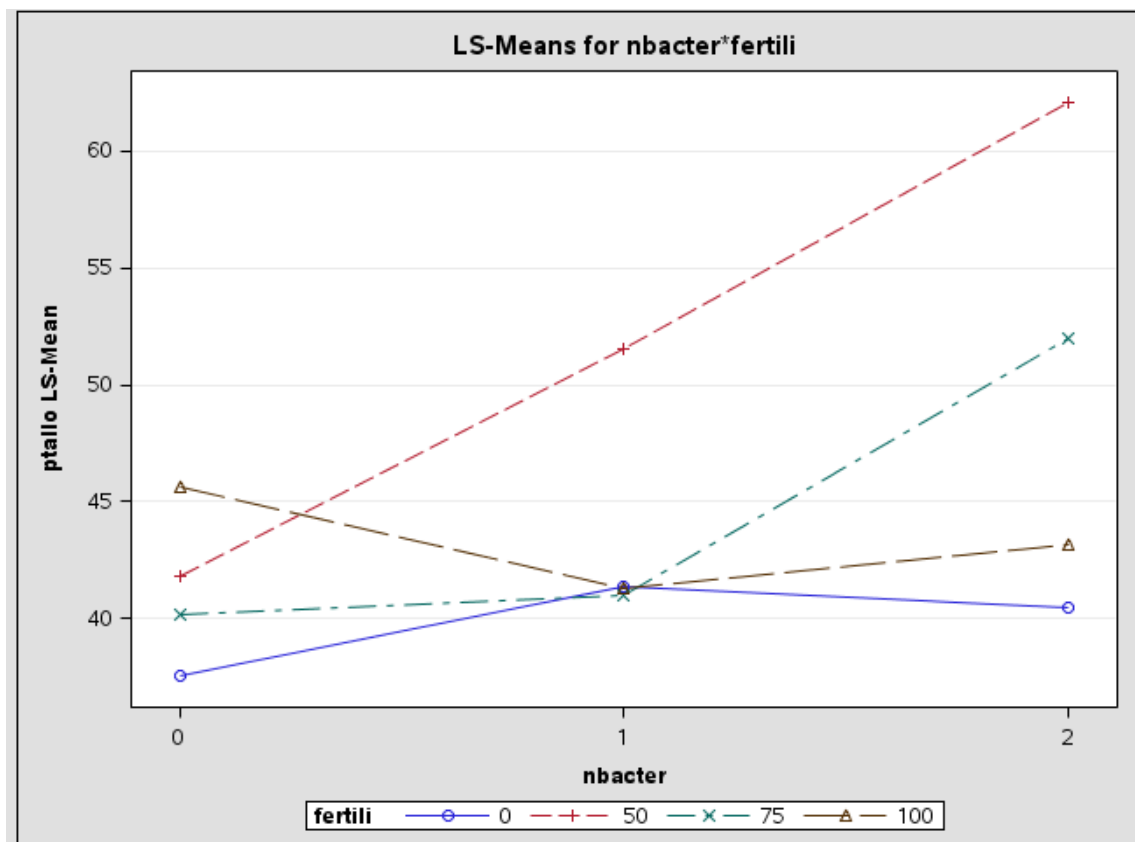


Diferencias de fertili medias de mínimos cuadrados Ajuste para comparaciones múltiples: Dunnett							
fertili	_fertili	Estimate	Error estándar	DF	Valor t	Pr > t	Adj P
50	0	12.0444	1.0104	24	11.92	<.0001	<.0001
75	0	4.5778	1.0104	24	4.53	0.0001	0.0004
100	0	3.5556	1.0104	24	3.52	0.0018	0.0049



Diferencias de fertili medias de mínimos cuadrados									
fertili	_fertili	Estimate	Error estándar	DF	Valor t	Pr > t	Alpha	Inferior	Superior
0	50	-12.0444	1.0104	24	-11.92	<.0001	0.05	-14.1298	-9.9591
0	75	-4.5778	1.0104	24	-4.53	0.0001	0.05	-6.6632	-2.4924
0	100	-3.5556	1.0104	24	-3.52	0.0018	0.05	-5.6409	-1.4702
50	75	7.4667	1.0104	24	7.39	<.0001	0.05	5.3813	9.5520
50	100	8.4889	1.0104	24	8.40	<.0001	0.05	6.4035	10.5743
75	100	1.0222	1.0104	24	1.01	0.3218	0.05	-1.0632	3.1076

nbacter*fertiliMedias de mínimos cuadrados						
nbacter	fertili	Estimador	Error estándar	DF	Valor t	Pr > t
0	0	37.5333	1.2375	24	30.33	<.0001
0	50	41.8333	1.2375	24	33.80	<.0001
0	75	40.1667	1.2375	24	32.46	<.0001
0	100	45.6000	1.2375	24	36.85	<.0001
1	0	41.3333	1.2375	24	33.40	<.0001
1	50	51.5667	1.2375	24	41.67	<.0001
1	75	40.9667	1.2375	24	33.10	<.0001
1	100	41.2667	1.2375	24	33.35	<.0001
2	0	40.5000	1.2375	24	32.73	<.0001
2	50	62.1000	1.2375	24	50.18	<.0001
2	75	51.9667	1.2375	24	41.99	<.0001
2	100	43.1667	1.2375	24	34.88	<.0001

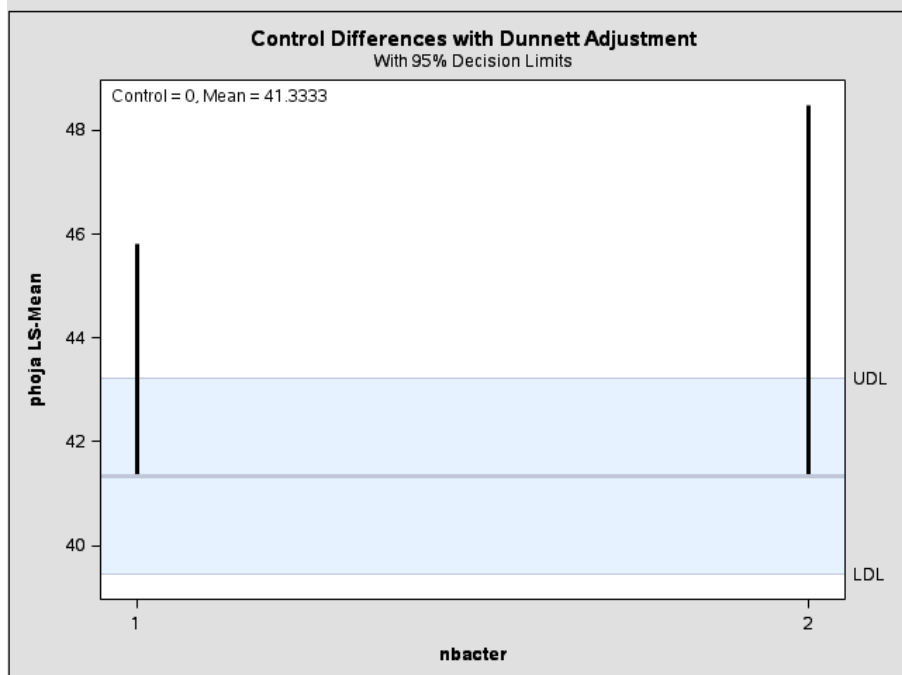


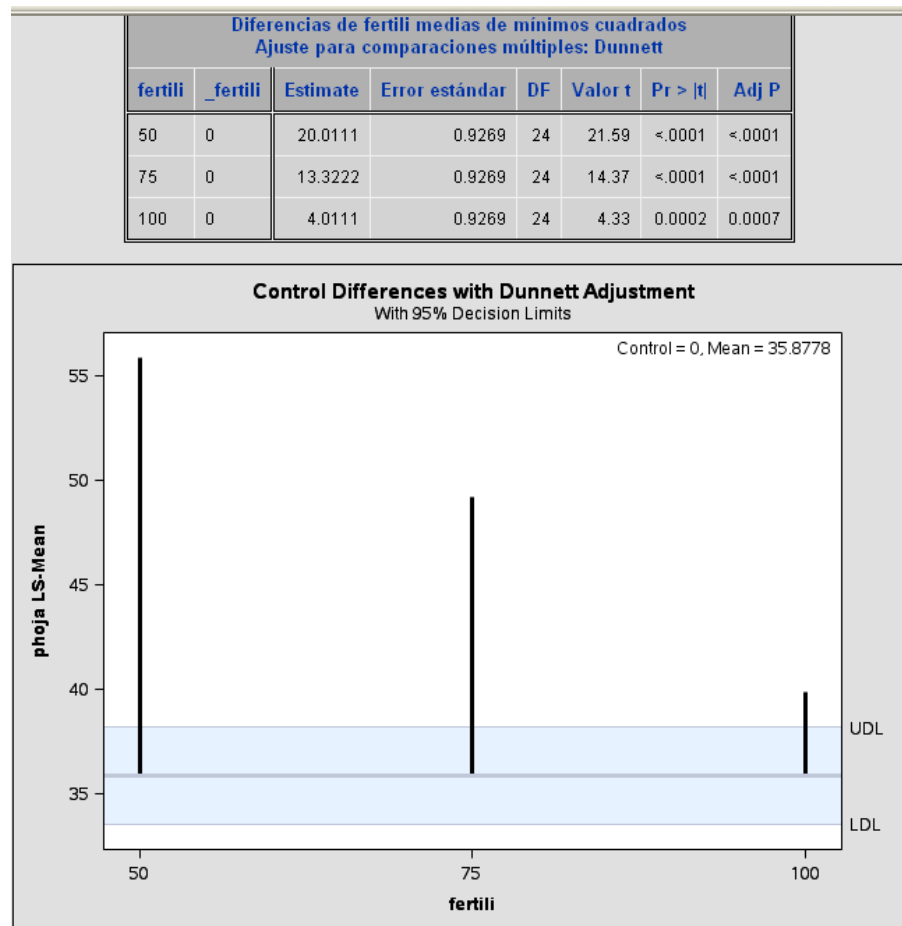
ANEXO 11. ANOVA PARA PESO DE HOJAS.

Tipo III Tests de efectos fijos				
Efecto	Num DF	Den DF	F-Valor	Pr > F
nbacter	2	24	40.54	<.0001
fertili	3	24	190.38	<.0001
nbacter*fertili	6	24	40.95	<.0001

nbacterMedias de mínimos cuadrados					
nbacter	Estimador	Error estándar	DF	Valor t	Pr > t
0	41.3333	0.5676	24	72.82	<.0001
1	45.8250	0.5676	24	80.73	<.0001
2	48.4833	0.5676	24	85.41	<.0001

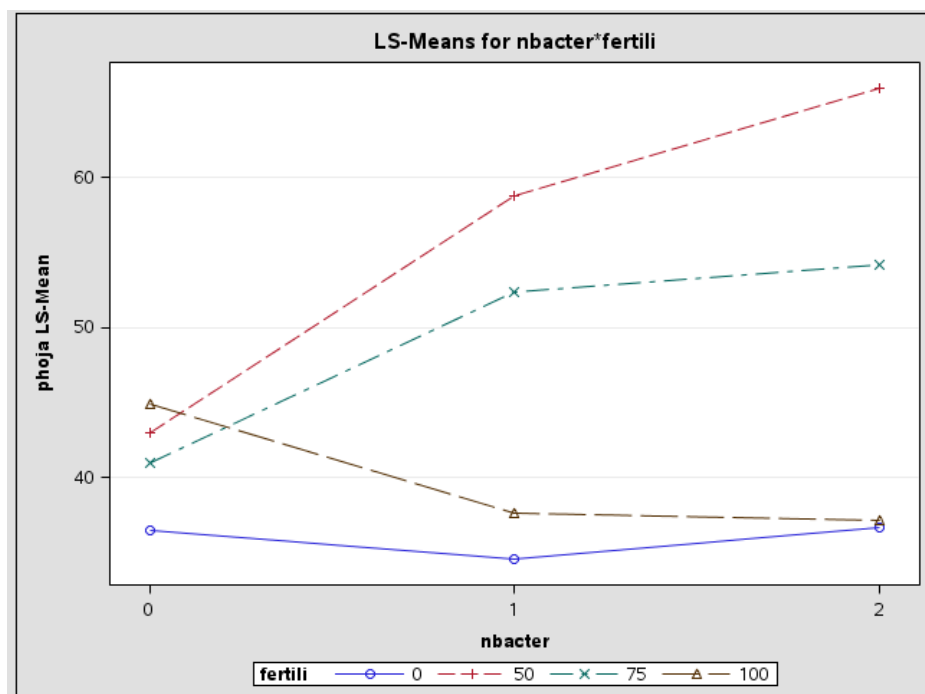
Diferencias de nbacter medias de mínimos cuadrados Ajuste para comparaciones múltiples: Dunnett							
nbacter	_nbacter	Estimate	Error estándar	DF	Valor t	Pr > t	Adj P
1	0	4.4917	0.8027	24	5.60	<.0001	<.0001
2	0	7.1500	0.8027	24	8.91	<.0001	<.0001





Diferencias de fertili medias de minimos cuadrados									
fertili	_fertili	Estimate	Error estándar	DF	Valor t	Pr > t	Alpha	Inferior	Superior
0	50	-20.0111	0.9269	24	-21.59	<.0001	0.05	-21.9242	-18.0980
0	75	-13.3222	0.9269	24	-14.37	<.0001	0.05	-15.2353	-11.4091
0	100	-4.0111	0.9269	24	-4.33	0.0002	0.05	-5.9242	-2.0980
50	75	6.6889	0.9269	24	7.22	<.0001	0.05	4.7758	8.6020
50	100	16.0000	0.9269	24	17.26	<.0001	0.05	14.0869	17.9131
75	100	9.3111	0.9269	24	10.05	<.0001	0.05	7.3980	11.2242

nbacter*fertiliMedias de mínimos cuadrados						
nbacter	fertili	Estimador	Error estándar	DF	Valor t	Pr > t
0	0	36.4667	1.1353	24	32.12	<.0001
0	50	42.9333	1.1353	24	37.82	<.0001
0	75	41.0000	1.1353	24	36.12	<.0001
0	100	44.9333	1.1353	24	39.58	<.0001
1	0	34.5333	1.1353	24	30.42	<.0001
1	50	58.7667	1.1353	24	51.77	<.0001
1	75	52.4000	1.1353	24	46.16	<.0001
1	100	37.6000	1.1353	24	33.12	<.0001
2	0	36.6333	1.1353	24	32.27	<.0001
2	50	65.9667	1.1353	24	58.11	<.0001
2	75	54.2000	1.1353	24	47.74	<.0001
2	100	37.1333	1.1353	24	32.71	<.0001

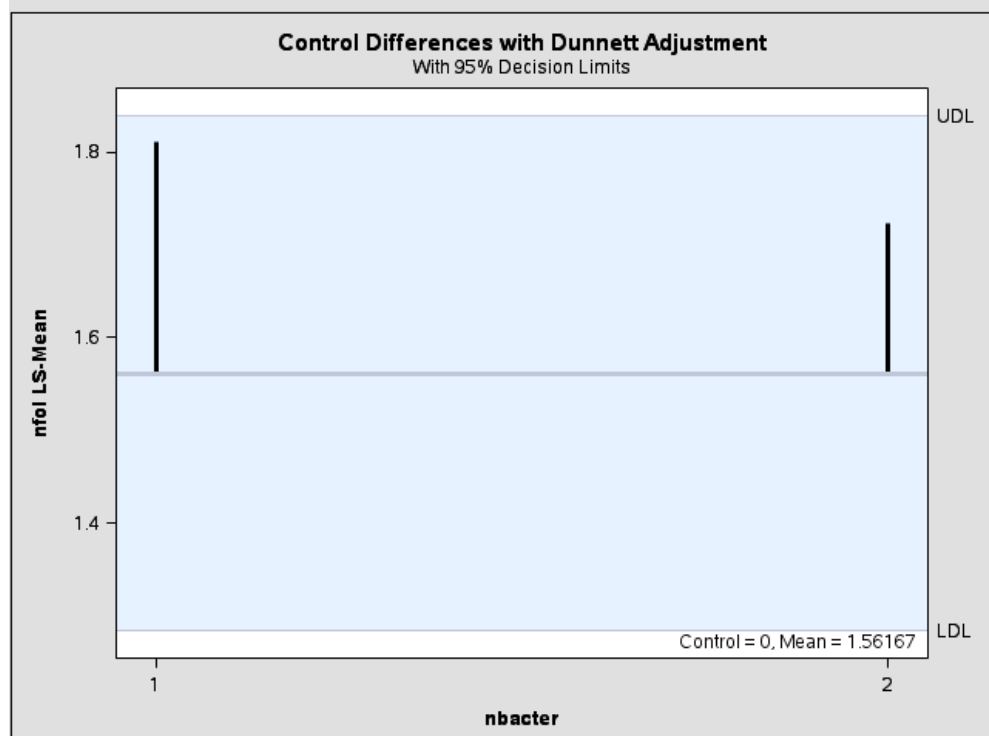


ANEXO 12. ANOVA PARA NITROGENO FOLIAR.

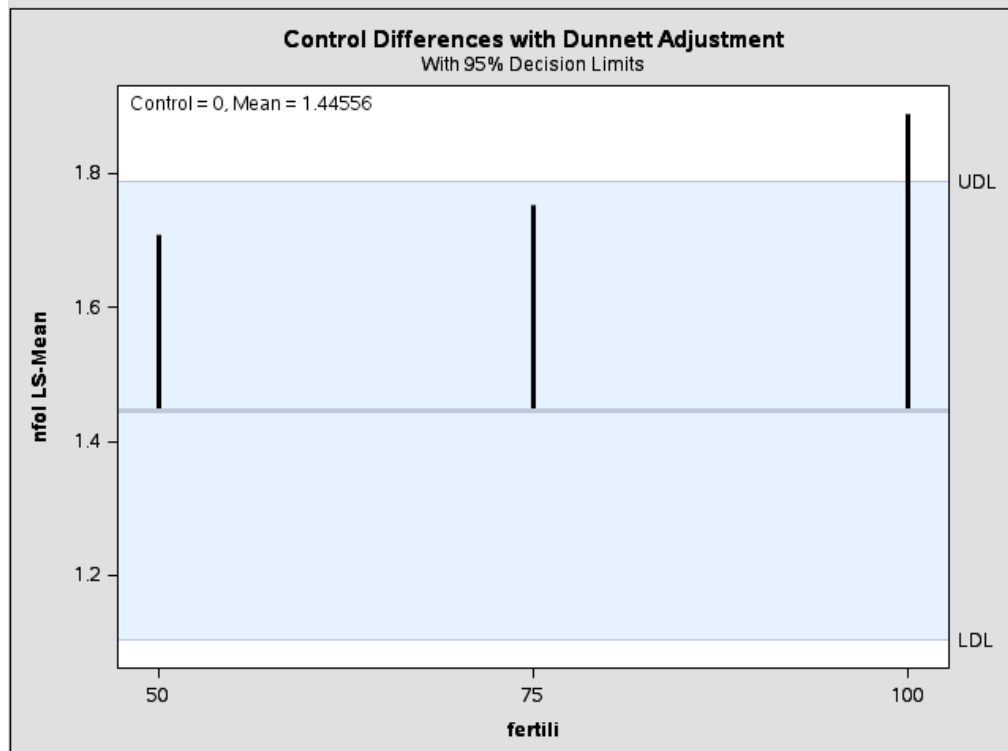
Tipo III Tests de efectos fijos					
Efecto	Num DF	Den DF	F-Valor	Pr > F	
nbacter	2	24	2.29	0.1230	
fertili	3	24	3.70	0.0256	
nbacter*fertili	6	24	1.01	0.4410	

nbacterMedias de mínimos cuadrados					
nbacter	Estimador	Error estándar	DF	Valor t	Pr > t
0	1.5617	0.08354	24	18.69	<.0001
1	1.8108	0.08354	24	21.68	<.0001
2	1.7233	0.08354	24	20.63	<.0001

Diferencias de nbacter medias de mínimos cuadrados Ajuste para comparaciones múltiples: Dunnett							
nbacter	_nbacter	Estimate	Error estándar	DF	Valor t	Pr > t	Adj P
1	0	0.2492	0.1181	24	2.11	0.0456	0.0819
2	0	0.1617	0.1181	24	1.37	0.1839	0.3064

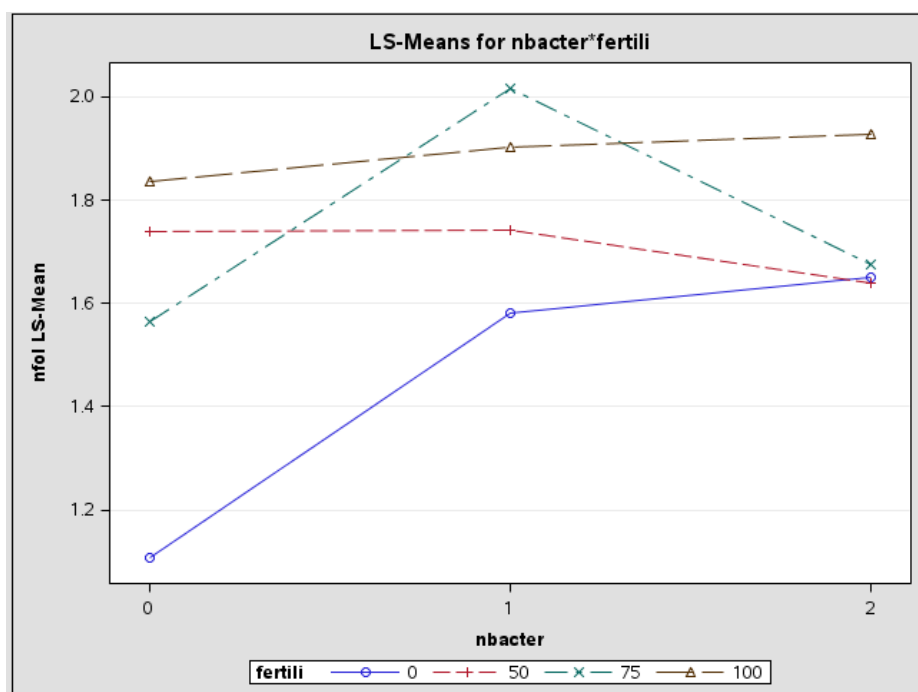


Diferencias de fertili medias de mínimos cuadrados Ajuste para comparaciones múltiples: Dunnett							
fertili	_fertili	Estimate	Error estándar	DF	Valor t	Pr > t	Adj P
50	0	0.2622	0.1364	24	1.92	0.0665	0.1600
75	0	0.3067	0.1364	24	2.25	0.0340	0.0855
100	0	0.4433	0.1364	24	3.25	0.0034	0.0093



Diferencias de fertili medias de mínimos cuadrados									
fertili	_fertili	Estimate	Error estándar	DF	Valor t	Pr > t	Alpha	Inferior	Superior
0	50	-0.2622	0.1364	24	-1.92	0.0665	0.05	-0.5438	0.01934
0	75	-0.3067	0.1364	24	-2.25	0.0340	0.05	-0.5882	-0.02511
0	100	-0.4433	0.1364	24	-3.25	0.0034	0.05	-0.7249	-0.1618
50	75	-0.04444	0.1364	24	-0.33	0.7474	0.05	-0.3260	0.2371
50	100	-0.1811	0.1364	24	-1.33	0.1968	0.05	-0.4627	0.1004
75	100	-0.1367	0.1364	24	-1.00	0.3264	0.05	-0.4182	0.1449

nbacter*fertiliMedias de mínimos cuadrados						
nbacter	fertili	Estimador	Error estándar	DF	Valor t	Pr > t
0	0	1.1067	0.1671	24	6.62	<.0001
0	50	1.7400	0.1671	24	10.41	<.0001
0	75	1.5633	0.1671	24	9.36	<.0001
0	100	1.8367	0.1671	24	10.99	<.0001
1	0	1.5800	0.1671	24	9.46	<.0001
1	50	1.7433	0.1671	24	10.43	<.0001
1	75	2.0167	0.1671	24	12.07	<.0001
1	100	1.9033	0.1671	24	11.39	<.0001
2	0	1.6500	0.1671	24	9.88	<.0001
2	50	1.6400	0.1671	24	9.82	<.0001
2	75	1.6767	0.1671	24	10.04	<.0001
2	100	1.9267	0.1671	24	11.53	<.0001



ANEXO 13. ANÁLISIS FÍSICOQUÍMICO DE VINAZA.



Calle 79 B No. 70 - 16 Bogotá D.C.
Teléfono: 2231999
Telefax: 2234087
e-mail: agrilab@etb.net.co

Página 1 de 1

Laboratorio de Análisis Químicos

Insumos Agrícolas

Registrado ante el ICA según Resolución 000584

Remitente	INCAUCA S.A. / Ing. Isabel Cristina Ospina		
Identificación suministrada	Mtra. 113 VINAZA		
Descripción	Líquido Café	No. Laboratorio	MO 15022
Fecha de Ingreso	12-abr-13	Fecha de Entrega	24-abr-13
CARACTERIZACIÓN Y COMPOSICIÓN DE MATERIAL ORGÁNICO LÍQUIDO			
PARAMETRO	RESULTADO	UNIDADES	METODO ANALITICO
Carbono Orgánico Oxidable Total	123	g/L	WALKLEY-BLACK (NTC 5187)
pH	4,35		POTENCIOMÉTRICO
Densidad (20°C)	1,18	g/c.c.	GRAVIMÉTRICO (NTC 5187)
Conductividad Eléctrica (1:200)	0,84	dS/m	CONDUCTÍMETRO
Sólidos Insolubles	12,2	g/L	GRAVIMÉTRICO (NTC 5187)
Nitrógeno (Norg+N-NH ₄ +N-NH ₂)	8,03	g/L	MICRO-KJELDAL (NTC 5187)
Nitrógeno Orgánico (Norg)	6,37	g/L	MICRO-KJELDAL (NTC 5187)
Nitrógeno Amoniacal (N-NH ₄)	1,66	g/L	VOLUMÉTRICO (NTC 5187)
Nitrógeno Nitrato (N-NO ₃)	N.D.	g/L	COLORIMÉTRICO (NTC 5187)
Nitritos (NO ₂)	N.D.	g/L	POTENCIOMÉTRICO
Fósforo Soluble en Agua (P ₂ O ₅)	0,42	g/L	COLORIMÉTRICO (NTC 5187)
Potasio Soluble en agua (K ₂ O)	42,7	g/L	ABS. ATÓMICA (NTC 5187)
Calcio Soluble en Agua (CaO)	10,1	g/L	ABS. ATÓMICA (NTC 5187)
Magnesio Soluble en Agua (MgO)	5,79	g/L	ABS. ATÓMICA (NTC 5187)
Azufre Soluble en Agua (S-SO ₄)	11,1	g/L	TURBIDIMÉTRICO (NTC 5187)
Hierro Soluble en Agua	0,19	g/L	ABS. ATÓMICA (NTC 5187)
Manganeso Soluble en Agua	26	p.p.m	ABS. ATÓMICA (NTC 5187)
Cobre Soluble en Agua	4,7	p.p.m	ABS. ATÓMICA (NTC 5187)
Zinc Soluble en Agua	3,0	p.p.m	ABS. ATÓMICA (NTC 5187)
Boro Soluble en Agua	1,7	p.p.m	COLORIMÉTRICO (NTC 5187)
Sodio Soluble en Agua	0,69	g/L	EMISIÓN DE LLAMA (NTC 5187)
Sílice Soluble SiO ₂	10,6	g/L	ABS. ATÓMICA (NTC 5187)
ADICIONALES			
Carbonatos (CO ₃ =)	N.D.	g/l	VOLUMÉTRICO (NTC 5187)
Bicarbonatos (HCO ₃ -)	N.D.	g/l	VOLUMÉTRICO (NTC 5187)
Cloruros (Cl-)	N.D.	g/l	VOLUMÉTRICO (NTC 5187)
Aluminio	N.D.	g/l	ABS. ATÓMICA (NTC 5187)
Molibdeno	N.D.	g/l	ABS. ATÓMICA (NTC 5187)

OBSERVACIONES:

1. Si usted tiene alguna inquietud, queja o reclamo sobre sus resultados, por favor comuníquese con el Director técnico o con el Coordinador de área.
2. El alcance de la responsabilidad de AGRILAB en el presente informe, se limita a la realización de los análisis de laboratorio relacionados y descritos anteriormente, más NO A GARANTIZAR los productos en su concepción, diseño, calidad y eficiencia.
3. Los resultados analíticos consignados en el presente informe corresponden exclusivamente a la muestra enviada por el cliente y no a otro(s) materiales de la misma procedencia.
4. La contramuestra de la muestra analizada se almacenará por un periodo de tiempo de 6 meses, luego será desechada.

ATENTAMENTE,

MYRIAM BENDECK LUGO
Química Director Técnico PQ-1168

OSCAR J. PARRA CORTÉS
Químico Industrial Coordinador De Área

ANEXO 14. PROTOCOLO DE EXTRACCIÓN DE ADN.

Steps in the protocol

1. Resuspend the cell pellet (approximately 0.1 g) completely with 564 μ l TE buffer (use a sterile toothpick to mix the pellet and ensure complete resuspension).
2. Add approximately 10 μ g lysozyme (crystalline) to the cell suspension (from this point, do not vortex!). Mix thoroughly by inverting the Eppendorf tube several times. Incubate 10–60 minutes at 37 °C. Add 6 μ l Proteinase K (10 mg/ml), and 30 μ l SDS (10–20%). Mix thoroughly (do not vortex!). Incubate at 37 °C until the suspension becomes relatively clear and viscous.
3. Add 100 μ l NaCl (5 M) and mix thoroughly (do not vortex!). Incubate suspension at 65 °C, 2 minutes. Add 80 μ l CTAB/NaCl solution (preheated at 65 °C, use a pipette tip with the tip cut off to pipette the viscous CTAB/NaCl solution) and mix thoroughly (do not vortex!). Incubate suspension at 65 °C, 10 minutes.
4. Extract suspension with an equal volume (approximately 800 μ l) chloroform/isoamyl alcohol (24:1) solution. Centrifuge (10,000 $\times$ g, 5 minutes) Transfer the upper (aqueous) phase (Supernatant 1), containing the nucleic acids, into a separate 2.0 ml Eppendorf tube.
5. Extract Supernatant 1 with an equal volume (approximately 800 μ l) of phenol/chloroform/isoamyl alcohol (25:24:1) solution. Centrifuge (15,000 $\times$ g, 5 minutes). Transfer the upper (aqueous) phase (Supernatant 2), containing the nucleic acids, into a separate 2.0 ml Eppendorf tube.
6. Extract Supernatant 2 with an equal volume (approximately 800 μ l) chloroform:isoamyl alcohol (24:1) solution. Centrifuge (10,000 $\times$ g, 5 minutes). Transfer the upper (aqueous) phase (Supernatant 3), containing the nucleic acids, into a separate 2.0 ml Eppendorf tube.
7. Add 0.7 volumes (approximately 560) isopropanol to precipitate nucleic acids. Mix gently by inverting the tube several times – the DNA should appear as a white, viscous, precipitate. Let sit at room temperature for 5 minutes to 1 hour. Centrifuge (12,000–15,000 $\times$ g 15–30 minutes) at room temperature. The DNA should be visible as a pellet on the side of the Eppendorf tube. Remove the isopropanol carefully, so as to avoid disturbing the pellet.
8. Wash the pellet with 500 μ l EtOH (70%) by inverting the tube several times. Centrifuge 12,000–15,000 $\times$ g, 15–30 minutes at room temperature. Carefully remove the EtOH and blot the rim of the tube with a paper towel to get rid of excess liquid.
9. Briefly (not more than 5 minutes) dry pellet in a speed-vac.
10. Resuspend each pellet in 50–60 μ l TE Buffer. Let sit at 37 °C to allow the DNA to be resuspended completely.
11. Estimate the concentration of DNA in suspension by spectrophotometric measurement at 260 nm. For double-stranded DNA suspensions, at a wavelength of 260 nm and using a cuvette with a 1 cm light path, an OD of 1.0 is equal to a concentration of 50 Mg/ml. The quality of the DNA can be

estimated by measurements of the A_{260}/A_{280} and the A_{260}/A_{230} ratios. The size of the DNA can be estimated by agarose gel (0.5%, w/v) electrophoresis, subsequent staining with ethidium bromide and visualization by U.V. illumination. DNA of uniform size (approximately 20 kb) indicates that the DNA has been extracted without excessive shearing. DNA which has been sheared or degraded by nucleases will appear as a broad smear, of smaller molecular weight products.