

**SELECCIÓN DE BACTERIAS PROMOTORAS DE CRECIMIENTO VEGETAL
PRESENTES EN UNA PRADERA COMPUESTA DE PASTO KIKUYO
Pennisetum clandestinum Y RYEGRASS *Lolium* sp Y EVALUACIÓN DE SU
EFICIENCIA EN EL MUNICIPIO DE NEMOCÓN, CUNDINAMARCA.**

**EVELYN ALEJANDRA MA FONSECA
JOHAN ALEXANDER TORRES GONZÁLEZ**

**CORPORACIÓN UNIVERSITARIA MINUTO DE DIOS
FACULTAD DE INGENIERÍA
AGROECOLOGÍA
BOGOTÁ D.C
2013**

**SELECCIÓN DE BACTERIAS PROMOTORAS DE CRECIMIENTO VEGETAL
PRESENTES EN UNA PRADERA COMPUESTA DE PASTO KIKUYO
Pennisetum clandestinum Y RYEGRASS *Lolium* sp Y EVALUACIÓN DE SU
EFICIENCIA EN EL MUNICIPIO DE NEMOCÓN, CUNDINAMARCA.**

**EVELYN ALEJANDRA MA FONSECA
JOHAN ALEXANDER TORRES GONZÁLEZ**

**TRABAJO DE GRADO PARA OPTAR EL TÍTULO DE INGENIERO EN
AGROECOLOGÍA**

Dirección

**ASTRID XIMENA CORTÉS LOZANO
INGENIERO EN AGROECOLOGÍA, M.Sc EN BIOLOGÍA APLICADA**

Codirección

**OMAR GUERRERO GUERRERO
INGENIERO AGRÓNOMO M.Sc EN FITOPATOLOGÍA**

**CORPORACIÓN UNIVERSITARIA MINUTO DE DIOS
FACULTAD DE INGENIERÍA
AGROECOLOGÍA
BOGOTÁ D.C**

2013

Nota de aceptación:

Firma del presidente del Jurado

Firma del Jurado

Firma del Jurado

Bogotá D.C 06, 11, 2013

DEDICATORIA

A Dios, principio de todo y sabiduría infinita.

A nuestros padres por su apoyo, esfuerzo y dedicación

AGRADECIMIENTOS

A todas aquellas personas que nos colaboraron a lo largo de este proceso, principalmente a nuestros familiares, profesores y demás profesionales involucrados.

Al doctor Sair Alfonso Alvarado Salazar, por la confianza depositada en este proyecto y su colaboración al prestarnos su finca para llevar a cabo el presente estudio.

CONTENIDO

| | pág. |
|--|------|
| RESUMEN..... | 15 |
| INTRODUCCIÓN..... | 17 |
| 1. PROBLEMÁTICA..... | 19 |
| 1.1 ANTECEDENTES DEL PROBLEMA..... | 19 |
| 1.2 FORMULACIÓN DEL PROBLEMA..... | 20 |
| 1.3 DESCRIPCIÓN DEL PROBLEMA..... | 21 |
| 2. JUSTIFICACIÓN..... | 23 |
| 3. OBJETIVOS..... | 25 |
| 3.1 OBJETIVO GENERAL..... | 25 |
| 3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS..... | 25 |
| 4. REVISIÓN DE LITERATURA..... | 26 |
| 4.1 IMPORTANCIA DE LA GANADERÍA..... | 26 |
| 4.2 PROBLEMÁTICAS AMBIENTALES GENERADAS POR LA ACTIVIDAD GANADERA..... | 26 |
| 4.3 EFECTOS DE LA FERTILIZACIÓN DE SÍNTESIS QUÍMICA..... | 28 |
| 4.4 GENERALIDADES DEL PASTO KIKUYO (<i>Pennisetum clandestinum</i>)..... | 30 |
| 4.5 GENERALIDADES DEL PASTO RYE GRASS (<i>Lolium sp</i>)..... | 30 |
| 4.6 MUNICIPIO DE NEMOCÓN EN LA ACTIVIDAD AGROPECUARIA..... | 31 |
| 4.6.1 Ubicación..... | 31 |

| | |
|---|----|
| 4.6.2 Condiciones ambientales..... | 31 |
| 4.6.3 Uso del suelo..... | 31 |
| 4.6.4 Uso agrícola..... | 32 |
| 4.6.5 Uso pecuario..... | 32 |
| | |
| 4.7 IMPORTANCIA DE LOS MICROORGANISMOS EN LA INTERACCIÓN SUELO PLANTA..... | 32 |
| 4.8 BACTERIAS PROMOTORAS DE CRECIMIENTO VEGETAL..... | 33 |
| 4.8.1 <i>Azospirillum</i> | 34 |
| 4.8.2 <i>Azotobacter</i> | 34 |
| 4.8.3 <i>Rhizobium</i> | 35 |
| 4.8.4 <i>Pseudomonas</i> | 35 |
| | |
| 4.9 ASPECTOS DE LA INOCULACIÓN DE BACTERIAS..... | 35 |
| 4.9.1 Inoculación con <i>Azospirillum</i> | 36 |
| 4.9.2 Inoculación con <i>Rhizobium</i> | 36 |
| 4.10 BIOFERTILIZANTES..... | 37 |
| | |
| 5. HIPÓTESIS..... | 38 |
| | |
| 6. MÉTODOS..... | 39 |
| 6.1 UBICACIÓN..... | 39 |
| 6.2 MUESTREO..... | 39 |
| 6.3 PROCESAMIENTO DE LA MUESTRA..... | 39 |
| 6.3.1 Recuento de bacterias totales en el suelo..... | 39 |
| 6.3.2 Obtención y aislamiento de bacterias solubilizadoras de fosfato..... | 39 |
| 6.3.3 Obtención y aislamiento de bacterias fijadoras de nitrógeno..... | 40 |
| 6.3.4 Caracterización fenotípica..... | 40 |

| | |
|--|----|
| 6.4 EVALUACIÓN DE LAS BACTERIAS PROMOTORAS DE CRECIMIENTO VEGETAL AISLADAS EN LABORATORIO..... | 41 |
| 6.4.1 Evaluación cualitativa de la actividad fosfato solubilizadora..... | 41 |
| 6.4.2 Determinación del fósforo disponible por la técnica de SPECTROQUANT® (AFM) MERCK..... | 41 |
| 6.4.3 Síntesis de ácido indolacético..... | 42 |
| 6.4.4 Identificación molecular por secuenciación parcial de 16s rDNA..... | 42 |
| 6.4.5 Curva de crecimiento de los aislamientos seleccionados..... | 43 |
| 6.5 EVALUACIÓN EN CAMPO..... | 44 |
| 6.5.1 Análisis estadístico..... | 45 |
| 7. PRESENTACIÓN Y DISCUSIÓN DE LOS RESULTADOS..... | 46 |
| 7.1 PROCESAMIENTO DE LA MUESTRA..... | 46 |
| 7.1.1 Recuento de bacterias totales en el suelo..... | 46 |
| 7.1.2 Obtención y aislamiento de bacterias solubilizadoras de fosfatos..... | 46 |
| 7.1.3 Obtención y aislamiento de bacterias fijadoras de nitrógeno..... | 46 |
| 7.1.4 Caracterización fenotípica..... | 47 |
| 7.2 EVALUACIÓN DE LAS BACTERIAS PROMOTORAS DE CRECIMIENTO VEGETAL AISLADAS EN LABORATORIO..... | 50 |
| 7.2.1 Evaluación cualitativa de la actividad fosfato solubilizadora..... | 50 |
| 7.2.2 Determinación del fósforo disponible por la técnica de SPECTROQUANT® (AFM) MERCK..... | 52 |
| 7.2.3 Síntesis de ácido indolacético..... | 54 |
| 7.2.4 Identificación molecular por secuenciación parcial de 16s rDNA..... | 55 |
| 7.2.5 Curva de crecimiento de los aislamientos seleccionados..... | 56 |
| 7.3 EVALUACIÓN EN CAMPO..... | 58 |
| 7.3.1 Análisis estadístico..... | 58 |
| CONCLUSIONES..... | 64 |

BIBLIOGRAFÍA.....65

ANEXOS.....79

LISTA DE TABLAS

| | Pág |
|---|-----|
| Tabla 1. Estimación del NMP para cada una de las tres muestras evaluadas..... | 46 |
| Tabla 2. Caracterización fenotípica de los aislamientos fosfato solubilizadores..... | 47 |
| Tabla 3. Caracterización fenotípica de los aislamientos fijadores de nitrógeno..... | 49 |
| Tabla 4. Determinación del fósforo disponible cepa C7..... | 52 |
| Tabla 5. Determinación de fósforo disponible cepa C12..... | 52 |
| Tabla 6. Determinación de fósforo disponible cepa C16..... | 53 |

LISTA DE CUADROS

pág.

Cuadro1. Principales impactos ambientales de las actividades

Ganaderas en Colombia.....27

LISTA DE GRÁFICOS

| | pág. |
|--|------|
| Gráfica 1. Índices de solubilización obtenidos por los aislamientos solubilizadores..... | 50 |
| Grafica 2. Producción de AIA por las cepas fijadoras de nitrógeno..... | 54 |
| Grafica 3. Curva de crecimiento de <i>Pseudomonas</i> sp..... | 56 |
| Grafica 4. Curva de crecimiento de <i>Azotobacter</i> sp..... | 57 |
| Grafica 5. Promedio peso fresco parte aérea..... | 59 |
| Grafica 6. Promedio peso seco parte aérea..... | 59 |
| Grafica 7. Promedio porcentaje materia seca parte aérea..... | 60 |
| Grafica 8. Promedio peso fresco parte radicular..... | 60 |
| Grafica 9. Promedio peso seco parte radicular..... | 61 |
| Grafica 10. Promedio porcentaje materia seca parte radicular..... | 61 |

LISTA DE FIGURAS

| | pág. |
|---|------|
| Figura 1. Caracterización morfológica de las colonias..... | 40 |
| Figura 2. Índice de solubilización..... | 41 |
| Figura 3. Distribución de las unidades experimentales..... | 45 |
| Figura 4. Porcentaje de materia seca..... | 45 |
| Figura 5. Medios de cultivo utilizados para los aislamientos..... | 47 |
| Figura 6. Caracterización microscópica aislamiento C16..... | 48 |
| Figura 7. Siembra por agotamiento aislamiento C16..... | 48 |
| Figura 8. Caracterización microscópica aislamiento A15..... | 49 |
| Figura 9. Siembra por agotamiento aislamiento A15..... | 50 |
| Figura 10. Halo de solubilización aislamiento C16..... | 52 |

LISTA DE ANEXOS

| | pág. |
|--|------|
| Anexo A. Composición medio SRSM..... | 79 |
| Anexo B. Composición medio LGI..... | 79 |
| Anexo C. Curva patrón AIA..... | 80 |
| Anexo D. Electroforesis en gel agarosa al 1% para la cepa C16..... | 81 |
| Anexo E. Electroforesis en gel agarosa al 1% para la cepa A15..... | 82 |
| Anexo F. Electroferograma obtenido a partir de la secuencia del gen rDNA 16S para la cepa A15..... | 83 |
| Anexo G. Electroferograma obtenido a partir de la secuencia del gen rDNA 16S para la cepa C16..... | 84 |
| Anexo H. Análisis estadístico..... | 85 |

RESUMEN

En respuesta a las implicaciones ambientales que trae el uso indiscriminado de fertilizantes de síntesis química y la importancia actual de emplear alternativas sustentables, capaces de conservar los recursos naturales; se llevó a cabo un estudio en la finca Caseteja San Luis localizada en el municipio de Nemocón, con la finalidad de obtener y evaluar bacterias nativas, promotoras de crecimiento vegetal para la pradera compuesta de pastos Kikuyo (*Pennisetum clandestinum*) y Rye Grass (*Lolium* sp).

Tras la obtención de las muestras, se realizó el aislamiento primario en los medios de cultivo SRSM, tomando las colonias que presentaron halo de solubilización, por otra parte en medio LGI se tomaron las colonias con aspecto translucido, consistencia gomosa, entre otras. Posteriormente, se evaluó la capacidad de los aislamientos en SRSM para solubilizar fósforo mediante el índice de solubilización y la determinación de fósforo disponible por la técnica de SPECTROQUANT® (AFM) MERCK en donde el aislamiento C16 presentó los mejores resultados con 2,42 I.S a las 28 horas y 22,5 ppm en 5 mL a las 22 horas respectivamente; mientras que para los aislamientos en LGI se midió la capacidad de estos para la producción de AIA en donde el aislamiento A15 obtuvo el mejor resultado con 12.7382 µg/mL.

Los aislamientos C16 y A15 fueron reconocidos como *Pseudomonas* sp y *Azotobacter* sp respectivamente, mediante la identificación molecular por secuenciación parcial de 16s rDNA. Luego se realizaron las curvas de crecimiento para cada una de las cepas a fin de observar su comportamiento.

Finalmente, para la valoración en campo se desarrolló un diseño experimental completamente al azar, con siete tratamientos y cuatro repeticiones, evaluando las variables biométricas: peso fresco (PF), peso seco (PS) y porcentaje de materia seca (MS%) tanto en la parte aérea como radicular de los pastos, trascurridos 90 días del establecimiento de la pradera. El análisis de varianza de un factor para los resultados obtenidos en el PF de la parte aérea indican que no existen diferencias significativas ($p > 0,05$) entre los tratamientos aplicados, sin embargo el promedio más alto lo presentó el tratamiento químico. Mientras que para el PS y MS% este análisis muestra que existen diferencias significativas entre los tratamientos ($p < 0.05$), siendo el tratamiento químico el de mejor desempeño.

Por otra parte, el análisis de varianza de un factor para PF de la parte radicular indica que no existen diferencias significativas entre los tratamientos ($p > 0.05$), presentando el mejor promedio el tratamiento absoluto seguido de la inoculación de la cepa FBN + CSF. Para el PS de la parte radicular el análisis de varianza de un factor indica que no existen diferencias significativas entre los tratamientos ($p > 0.05$), sin embargo el promedio más alto correspondió a la inoculación de CSF + el fertilizante nitrogenado seguido de la inoculación de FBN. Finalmente, el análisis de varianza de un factor para el MS% de la parte radicular indica que no

existen diferencias significativas entre los tratamientos ($p>0.05$), correspondiendo los promedios más altos a la inoculación individual de CSF y FBN.

Palabras clave: sustentable, fertilización, *Pseudomonas* sp, *Azotobacter* sp.

INTRODUCCIÓN

Las Bacterias Promotoras de Crecimiento Vegetal (BPCV), se encuentran asociadas de forma natural al hábitat rizosférico de las plantas, siendo de gran importancia aquellas que se puedan emplear en la producción agrícola. Estos tipos de asociación, favorecen el crecimiento vegetal a partir de mecanismos en los cuales la bacteria puede proporcionarle a la planta compuestos nitrogenados, hormonas de crecimiento o disponibilidad de nutrientes como hierro y fósforo (Sarabia, Madrigal, Martínez & Carreón, 2010).

En Latinoamérica se han desarrollado investigaciones acerca de la participación de los microorganismos y su interacción con la rizósfera, a fin de proponer acciones tecnológicas sustentables tanto a nivel productivo como ambiental en lo que se refiere a la fertilización (Izaguirre, Labandera, & Sanjuán, 2007). Sin embargo en los países tropicales, la fertilización química es una actividad que se desarrolla como el eje central para la producción de pastos y forrajes, aun teniendo como limitante el bajo aprovechamiento que tiene el sistema productivo sobre el fertilizante, debido a que se estima que la planta utiliza aproximadamente el 50% del producto aplicado, mientras que el restante se pierde debido a la lixiviación, volatilización, desnitrificación (Saikia & Vanita, 2007).

Este tipo de fertilización sintética más allá de ser un hábito histórico en la producción agrícola colombiana, se ha establecido como la alternativa principal para el mantenimiento de praderas de clima frío, constituidas principalmente por pasto Kikuyo y algunos mejorados como el Rye Grass, este proceso se sostiene como consecuencia de la necesidad que surge por aumentar rendimientos unitarios (Clavijo, 1998).

La problemática ambiental ocasionada por el uso de fertilizantes químicos, se evidencia en problemas de acidificación, salinización, toxicidad de las plantas, limitación para la absorción de nutrientes entre otros; situación que surge como consecuencia del manejo inadecuado y excesivo que se realiza de estos productos (Gómez, 2002).

Sin embargo, la naturaleza en su riqueza biológica a nivel edáfico ha desarrollado mecanismos como: la fijación de nitrógeno, solubilización de nutrientes, control de fitopatógenos, entre otras habilidades propias de los microorganismos, especialmente bacterias de vida libre o asociativa, capaces de estimular el crecimiento de las gramíneas (Loredo, López, & Espinosa, 2004), posibilitando la proyección de alternativas sostenibles del suelo que mitiguen los problemas ambientales adversos, producto de la aplicación de agroquímicos (Antoun & Prévost, 2005)

Teniendo en cuenta la problemática ambiental expuesta y la necesidad de potencializar una producción sustentable (Pedraza et al., 2010), se realiza este trabajo con el fin de contribuir en la investigación de BPCV y su efecto en las

praderas compuestas de pastos Kikuyo y Rye grass establecidas en la Sabana Centro, consolidándose a su vez como una alternativa para el mantenimiento de los pastos, en la Finca Caseteja, San Luis, Nemocón (Cundinamarca).

En Colombia, se han desarrollado investigaciones sobre bacterias asociadas a forrajes, cuyo enfoque se basa en la obtención y caracterización de éstas, como lo es el caso de: “Aislamiento e identificación de bacterias diazotróficas rizosféricas y endófitas asociadas a suelos y pastos del Valle y Sabana del Cesar en dos épocas climáticas” (Garrido, 2007); “Aislamiento e identificación de cepas de *Azospirillum* sp en pasto guinea (*Panicum máximum* Jacq.) del Valle del Cesar” (Cárdenas, Garrido, Bonilla & Baldani, 2010) y “Selección de cepas nativas de bacterias diazotróficas simbióticas asociadas a la leguminosa *Clitoria ternatea* en el César y la Guajira” (Cortés, 2011), lo que indica que existen estudios previos que aportan al tema de investigación y pueden considerarse como una base para el desarrollo del conocimiento acerca de BPCV asociadas a forrajes.

De esta manera, el objeto de este trabajo es la selección y evaluación de BPCV que permitan brindar alternativas frente a la fertilización convencional, para el manejo de las praderas dedicadas a la alimentación bovina en la finca Caseteja San Luis, localizada en la Sabana Centro (Cundinamarca).

Lo anterior se desarrolló, realizando en campo la recolección de muestras de suelo rizosférico, a fin de identificar en laboratorio las bacterias presentes en la zona con posible capacidad de promover el crecimiento de los pastos Kikuyo y Rye Grass. Finalmente para corroborar la efectividad de las BPCV obtenidas in-vitro, se llevaron a cabo procesos de inoculación en campo de las cepas bacterianas seleccionadas, empleando un diseño completamente al azar con siete tratamientos y cuatro repeticiones, evaluando las variables biométricas de peso seco (PS), peso fresco (PF) y porcentaje de materia seca (MS%) de la parte aérea y radicular de los pastos de la pradera compuesta a fin de evaluar su rendimiento en la finca Caseteja, San Luis.

1. PROBLEMÁTICA

1.1 ANTECEDENTES DEL PROBLEMA

En la actualidad se buscan alternativas que permitan una producción agrícola que contribuyan a la conservación de los recursos naturales, por este motivo:

Uno de los objetivos prioritarios de una agricultura más respetuosa con el medio ambiente es la reducción en la utilización de fertilizantes de síntesis química (fundamentalmente los nitrogenados), que constituyen una fuente de contaminación importante en los suelos y acuíferos...Una de las estrategias para disminuir el uso de estos insumos se basa en la utilización de microorganismos (Benítez. 2005, p.98).

En respuesta a lo anterior y la necesidad por mantener la calidad de los suelos, investigaciones científicas se orientan hacia el estudio de la diversidad genética y bioquímica de algunos microorganismos rizosféricos, capaces de desempeñar la fijación biológica de nitrógeno atmosférico, solubilización de fosfatos, producción de hormonas vegetales, sideróforos entre otros (Pedraza et al, 2010).

Los fertilizantes químicos, son formulas complejas a base de N,P,K y Mg, además de contener en algunos casos elementos menores dispuestos en diferentes porcentajes, su uso se efectúa debido a los resultados significativos obtenidos en las cosechas y sus rendimientos; utilizándose en grandes cantidades y en forma consecutiva (Chaverri, 1995). La alta producción de estos fertilizantes, es motivada por: la necesidad de producir alimentos agropecuarios suficientes de acuerdo a las exigencias que manifiestan las poblaciones de los países en vía de desarrollo (Gómez, 2002) a partir de la disponibilidad de nutrientes que limitan el crecimiento vegetal como los son el fósforo y nitrógeno (Semmartin, Di Bella & García de Salamone, 2010).

Para el caso de la fertilización en praderas de clima frío, éstas requieren una mayor cantidad del producto en comparación con las de clima cálido, puesto que para el establecimiento de gramíneas adaptadas a este clima, se recomienda la incorporación antes de la siembra de 200 a 300 kg/ha de calfos y 110 kg/ha de sulfomag, mientras que para las praderas de clima frío se recomienda la aplicación de 500 a 800 kg/ha de calfos (Silva, 2001).

Sin embargo, según Osorio (2007) el uso excesivo de los fertilizantes químicos, ocasionan en el suelo deterioros físicos, químicos y biológicos que afectan severamente la capacidad productiva de éstos.

Del mismo modo, Murgueitio (1999) afirma que la degradación, erosión y contaminación tanto del suelo como de fuentes hídricas, se pueden apreciar en los impactos ambientales más notorios que se presentan sobre los sistemas ecológicos, originados por el uso constante de fertilizantes sintéticos y otros agroquímicos.

Por su parte, Gómez (2002) atribuye a la aplicación de fertilizantes de síntesis química: la reducción de mesofauna y microflora, mineralización de materia orgánica, acidificación, lixiviación, salinización, insolubilización y perturbaciones en las actividades simbióticas. Finalmente, Garrido (2007), opina que “la fertilización de síntesis, es inviable por los costos ambientales, económicos y sociales”.

Además, el uso de fertilizantes químicos no es eficiente puesto que una proporción elevada de los mismos no llegan a cumplir la función por la cual se motivó su uso, por ejemplo, entre el 25 y 66% de los nutrientes que se colocan en el suelo mediante la aplicación de este insumo se pierden (Barg & Armand, 2007).

Laurin, Llosa, González & Porcuna (2006), respecto a lo anterior estiman que en la mayoría de lugares en donde se emplea la agricultura intensiva, únicamente entre el 50 – 70% del nitrógeno que se introduce es recuperado después de la cosecha, el excedente es sobre fertilización y causa eutrofización, desequilibrio global del nitrógeno y fósforo, entre otros ya mencionados.

A lo anterior se suma que la fabricación de algunos insumos, en su proceso de elaboración requieren una elevada inversión de energía como lo es el caso de fertilizantes nitrogenados, los cuales son sometidos a elevadas temperaturas, siendo este proceso ambientalmente indeseable al emitir contaminantes a los cuerpos de agua y a la atmosfera (Castilla, 2006).

Así, la calidad del suelo no depende únicamente de la composición química de los mismos sino que esta a su vez esta fuertemente influenciada por las interacciones y diversidad microbianas que habitan en él (Abril, 2003) como la interacción microorganismo-suelo y microorganismo planta (Garbeva, Van Veen & Van Elsas, 2004), de tal forma que estas relaciones pueden afectar los procesos de mineralización de nutrientes, solubilización de fosfatos y otros procesos biológicos asociados a la dinámica de nutrientes en el sistema productivo (García de Salamone et al., 2009)

Finalmente, como consecuencia de la razones previamente citadas se manifiesta en la actualidad la búsqueda de alternativas que además de reducir el uso de fertilizantes químicos, presenten un efecto positivo en la sostenibilidad productiva y ambiental; basándose principalmente en la asociación de plantas con microorganismos (Izaguirre et al., 2007),

1.2 FORMULACIÓN DEL PROBLEMA

Las explotaciones agropecuarias no deberán poner en peligro su capacidad para satisfacer las necesidades futuras. La pérdida de biodiversidad, el uso no sostenible del agua y la contaminación tanto de los suelos como de fuentes hídricas, son problemas que socavan la capacidad de los recursos naturales para seguir sosteniendo la agricultura. El cambio climático por su parte, que se traduce en una mayor frecuencia de fenómenos meteorológicos extremos, como sequías e inundaciones y en una disminución de las precipitaciones predecibles, ya está

teniendo repercusiones graves en la capacidad para alimentar a las poblaciones humanas y animales de determinadas regiones y comunidades, además está desestabilizando la comercialización de productos agropecuarios.

La mayoría de los esfuerzos hechos en el pasado, se han centrado en mejorar las semillas y velar porque se proporcione a los agricultores un conjunto de insumos sintéticos que les permitan aumentar los rendimientos, reproduciendo el modelo de los procesos industriales en que los insumos externos sirven para producir resultados con arreglo a un modelo lineal de producción, haciendo uso indiscriminado de fertilizantes que, además de contaminar el ambiente, son dependientes del precio del petróleo.

El cuestionamiento, que motivó el desarrollo de esta investigación correspondió a: ¿es posible promover el crecimiento vegetal en praderas compuestas con pasto Kikuyo y Rye Grass a partir del uso de bacterias nativas en el municipio de Nemocón, Cundinamarca?

1.3 DESCRIPCIÓN DEL PROBLEMA

Una de las técnicas para contrarrestar la baja productividad de los suelos, ha sido el uso de fertilizantes de síntesis química (Loredo et al., 2004). Sin embargo, se deduce que el uso de estos productos está alcanzando actualmente su máximo teórico, por lo que la aplicación de los mismos en un futuro será limitada (Gyaneshwar, Naresh, Parekh, & Poole, 2002).

Para la sociedad mundial, es importante promover ecosistemas saludables, disponibles para las generaciones futuras además de comenzar en ellos una producción sustentable de alimentos y biocombustibles. Por lo anterior, la comunidad científica ha desarrollado investigaciones, con la finalidad de buscar alternativas que potencialicen la producción y que a su vez sean favorables con el medio ambiente (Pedraza et al., 2010).

De esta manera, en las últimas décadas, las investigaciones se han enfocado en conocer la función de bacterias en la rizósfera de diversas gramíneas en las que se contemplan la caña de azúcar, maíz, sorgo y pastos tropicales, las cuales han demostrado ejercer una simbiosis asociativa (Echegaray-Alemán, 1995); con la capacidad de emplear mecanismos como: la fijación biológica de nitrógeno, producción de sustancias reguladoras de crecimiento, solubilización de algunos minerales, entre otros. Estos mecanismos son llevados a cabo según la funcionalidad biológica de cada bacteria (De-Bashan, Holguin, Glick, & Bashan, 2007).

A diferencia de lo anterior, no se cuenta o registran estudios en las regiones pertenecientes a la sabana centro colombiana frente al tema de BPCV en pastos, por lo que no se conoce de forma acertada la participación de estas dentro de la planta, generando inconsistencias en la manipulación e inoculación de estas bacterias bajo condiciones de campo, debido a las fluctuaciones existentes entre

las condiciones ambientales y edáficas de una zona a otra, pues se ha identificado que las bacterias asociadas a gramíneas dependen de los factores edafoclimáticos como: la humedad del suelo y su temperatura (Sala, Parton, Joyce, & Lauenroth, 1998), los cuales influyen en la colonización de la raíz, siendo por esto importante realizar investigaciones en campo de las BPCV con la finalidad de determinar su efecto en el desarrollo de un cultivo (Loredo et al., 2004).

2. JUSTIFICACIÓN

La actividad ganadera en Colombia, tiene gran importancia puesto que participa con el 1,6% del Producto Interno Bruto (PIB) nacional, aportando dentro del sector agropecuario el 20%, y en el sector pecuario el 53% del PIB, además de generar 950.000 empleos directos (Federación Colombiana de Ganaderos [Fedegan]. 2010) y constituir una expresión cultural en varias regiones (Lafaurie, 2008).

Esta actividad se desarrolla principalmente en potreros dedicados al pastoreo, debido a la abundancia de los forrajes (Sánchez & Villaneda, 2009) y su explotación corresponde a la producción intensiva del sistema aéreo de las plantas, las cuales requieren diferentes nutrientes para un óptimo rendimiento (Sierra, 2002).

Para suplir la necesidad de estos nutrientes se realiza el proceso de fertilización (Bernal & Espinosa, 2003), que para el caso del mantenimiento de las praderas de clima frío, constituidas principalmente por los pastos Kikuyo y Rye Grass se basan en una fertilización convencional, devolviendo a los suelos propios del lugar (clasificados como de baja y mediana fertilidad), los nutrientes extraídos por los pastos (Silva, 2001). Sin embargo, debido a las prácticas inadecuadas de fertilización con productos de síntesis química, se han generado las problemáticas ambientales citadas con anterioridad.

Una alternativa para mitigar los impactos negativos ocasionados por la fertilización química, corresponde a la opción tecnológica del uso de microorganismos y/o bacterias nativas, con el propósito de minimizar la aplicación de productos sintéticos, reduciendo la contaminación de los suelos y aguas freáticas, a la vez que se disminuyen los costos de producción, mejorando así la competitividad de los sistemas ganaderos (Cortés, 2011).

Los microorganismos, son una tecnología que favorece la sustentabilidad de los ecosistemas, permitiendo la reducción del uso de agroquímicos dependientes del precio del petróleo, especialmente aquellos fertilizantes nitrogenados cuyo uso puede impactar nocivamente el ambiente (Pedraza et al., 2010); igualmente se considera que es posible proteger el ambiente, manteniendo limpios el agua, aire y principalmente preservando el recurso suelo mediante la acción de los microorganismos edáficos que proporcionen a las plantas los nutrientes que estas requieren (Burbano, 2006).

Respecto al tema, Castilla (2006) considera que los microorganismos fijadores de nitrógeno y solubilizadores de fósforo, al disponer los nutrientes para las plantas en la solución del suelo, permiten una mejor absorción de los mismos, lo que repercute en el mejoramiento de la fertilidad a nivel edáfico, siendo esta una alternativa para reducir el uso de insumos químicos.

Dentro de estos microorganismos se encuentran las bacterias promotoras de crecimiento vegetal (BPCV), las cuales son un grupo caracterizado por el hecho de participar en el desarrollo y producción vegetal, destacándose dentro de estas los géneros *Azospirillum*, *Rhizobium* y *Pseudomonas* (De-Bashan et al., 2007).

En Colombia, la información acerca de la selección de bacterias promotoras de crecimiento vegetal asociadas a forrajes es escasa o poco disponible, sin embargo se encuentran artículos que aportan al tema, la evaluación de poblaciones bacterianas asociadas a pasturas como es el caso de; Cárdenas et al. (2010), quienes realizaron el “Aislamiento e identificación de cepas de *Azospirillum* sp en pasto guinea (*Panicum máximum* Jacq.) del Valle del Cesar” dando como resultado la obtención de 184 aislamientos, de los cuales 16 se caracterizaron fenotípicamente como del género *Azospirillum* y se seleccionaron ocho por su similitud con el género en estudio. Sin embargo, el estudio no profundiza en evaluar la capacidad promotora de crecimiento vegetal por parte de *Azospirillum* sp en el forraje, pero es un importante aporte para el conocimiento de las poblaciones bacterianas asociadas a pastos en el suelo nacional.

Otro trabajo desarrollado por Garrido (2007), referente al tema de la evaluación de poblaciones bacterianas asociadas a forrajes, resultó en 11 aislamientos seleccionados por su capacidad de reducción de Acetileno (ARA), determinándose que estos aislamientos pertenecen a los géneros *Azospirillum* y *Klebsiella*, los cuales podrían ser utilizados como posibles biofertilizantes.

La necesidad de efectuar investigaciones acerca de BPCV para la producción de forrajes en la ganadería, resulta de la verificación en la literatura que destaca la importancia que tiene esta actividad en el país, las problemáticas ambientales que causa el uso de fertilizantes químicos, el bajo registro o disponibilidad de información acerca de investigaciones referentes a las BPCV en los forrajes y finalmente la posibilidad de utilizar a tales bacterias como alternativa de biofertilización, como lo menciona Pedraza et al. (2010) resulta primordial el conocimiento de la microbiota, sean estas fijadoras de nitrógeno, solubilizadoras de fosfatos o participantes en otras actividades, las cuales se asocien a los diferentes cultivos agrícolas, con el propósito de maximizar los efectos benéficos de la biofertilización, que permitan desarrollar una producción agrícola más sustentable. De esta manera, el uso de microorganismos con capacidad de promover el crecimiento vegetal se presenta como una importante alternativa.

3. OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GENERAL

Evaluar la eficiencia de cepas bacterianas promotoras de crecimiento vegetal asociadas a la pradera compuesta de pasto Kikuyo (*Pennisetum clandestinum*) y Rye Grass (*Lolium* sp), en las condiciones edafoclimáticas presentes en el municipio de Nemocón, Cundinamarca.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Identificar y caracterizar fenotípicamente cepas bacterianas con potencial biofertilizante a partir de la rizósfera de *Pennisetum clandestinum* y *Lolium* sp en la finca Caseteja San Luis (Nemocón, Cundinamarca).
- Determinar la capacidad de promoción de crecimiento vegetal de las cepas seleccionadas, a partir de pruebas bioquímicas que indiquen de manera indirecta el efecto promotor de desarrollo en los pastos de la sabana centro.
- Evaluar la eficiencia de las cepas seleccionadas como promisorias sobre indicadores de productividad agronómica en la pradera compuesta de las gramíneas forrajeras *Pennisetum clandestinum* y *Lolium* sp.

4. REVISIÓN DE LITERATURA

4.1 IMPORTANCIA DE LA GANADERÍA

En muchos países en desarrollo, la cría de ganado es una actividad multifuncional, más allá de su papel directo en la generación de alimentos e ingresos, el ganado es un bien valioso que sirve como almacén de riqueza, aval en la obtención de créditos y red de seguridad fundamental durante tiempos de crisis (Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación [FAO].2009, p.3).

Así mismo, el manejo de los animales siempre ha estado presente en la agricultura campesina (Gianella, Pinzás, & Ugás, 2010), y en la actualidad “el ganado representa el 40% del valor mundial de la producción agrícola y es la base de los medios de subsistencia y la seguridad alimentaria de casi mil millones de personas” (FAO.2009, p.3). Para el caso del contexto nacional la actividad ganadera se desarrolla en cinco regiones bien definidas. 1) Zona Norte o Llanuras del Caribe, 2) Zona del Valle Magdalena y Región Andina, 3) Zonas del Río Cauca, 4) Región Sur y 5) Zona de los Llanos Orientales (Garrido, 2007).

Según Fedegan (2010) en la actualización de las cifras del documento Plan Estratégico de la Ganadería Colombiana 2019 (PEGA), tenemos que la actividad agropecuaria aporta el 8,5% del PIB nacional, la ganadería participa con el 1,6% PIB nacional y dentro de los sectores agropecuario y pecuario aporta el 20% y 53% de PIB, respectivamente, además genera 950.000 empleos directos y utiliza un mayor empleo familiar que externo debido a que la mayoría de las explotaciones son a pequeña escala.

En el inventario ganadero Colombiano según el Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural, Departamento Administrativo Nacional de Estadística y Corporación Colombia Internacional (2010), existen 27'753.990 cabezas de las cuales el 74% se destinan a carne, 5% a leche y el 21% restante al doble propósito.

Es así como la ganadería colombiana es una actividad muy implementada y de gran importancia socioeconómica (Mahecha, Gallego, & Peláez, 2002), además permite la ocupación pacífica de las zonas rurales y en algunos casos forma parte de la identidad cultural de algunas regiones (Lafaurie, 2008).

4.2 PROBLEMÁTICAS AMBIENTALES GENERADAS POR LA ACTIVIDAD GANADERA

La ganadería tiene un impacto marcado en el medio ambiente, pues es la actividad que mayor demanda tiene del recurso suelo. El pastoreo ocupa el 26% de la superficie mundial, excluyendo la que está cubierta por hielo, mientras un tercio de la superficie apta para el cultivo agrícola es utilizada en la producción de alimentos para el ganado (FAO, 2009).

A la actividad ganadera se le atribuye la participación en la elevada tasa de deforestación en América Tropical, aunque no es la única responsable de este fenómeno, el cual se desarrolla sobre la reducción de ecosistemas naturales, especialmente bosque tropical y de montaña y en menor proporción de humedales y zonas costeras (Murgueitio & Ibrahim, 2008). Si bien, los principales daños ambientales de esta actividad no se han estudiado a profundidad, se subraya que los impactos ambientales más notorios sobre los ecosistemas son: la erosión y compactación del suelo, la eliminación de la sucesión vegetal por el uso de herbicidas y la contaminación del agua y el suelo por el uso constante de fertilizantes sintéticos y plaguicidas (Murgueitio, 1999).

Finalmente, para el contexto Colombiano, en el Cuadro 1 se indica la clasificación hecha por Murgueitio (1999), producto de un estudio que realizó acerca de los principales impactos ambientales que generan los procesos y prácticas ganaderas de producción, en el se indica el grado de impacto de acuerdo a las siguientes cinco categorías: reducido (1), ligero (2), considerable (3), alto (4) y muy alto (5). (Ver cuadro 1).

Cuadro 1. Principales Impactos Ambientales de las actividades ganaderas en Colombia.

| | SUELO | AGUA | AIRE | ENERGÍA | BIODIVERSIDAD | | |
|---|--|--|--|--|--|--|--|
| PROCESOS Y PRACTICAS GANADERAS DE PRODUCCION, TRANSPORTACION Y TRANSFORMACION | Compactación, Erosión, Actividad Biológica | Disminución del balance hídrico, Contaminación orgánica y química, Eutrofización | Gases de invernadero, malos olores, Emisión de metano, Hidrocarburos | Irradiación de calor, disminución de fotosíntesis. Uso de combustibles fósiles | Transformación de biomasa terrestres y acuáticos | Pérdida o transformación severa de ecosistemas naturales | Amenaza o extinción de especies de flora y fauna |
| Tala y quema de bosques | 4 | 3 | 3 | 2 | 4 | 4 | 5 |
| Apertura de vías ganaderas | 2 | 2 | 1 | 1 | 2 | 3 | 3 |
| Deseccación de humedales | 2 | 5 | 2 | | 2 | 3 | 4 |
| Monocultivo de gramíneas | 3 | 3 | 2 | 2 | 3 | 4 | 4 |
| Quemas | 3 | 3 | 4 | 3 | 2 | 3 | 3 |
| Control físico de la sucesión vegetal | 2 | 1 | | 1 | | | 2 |
| Control químico de la sucesión vegetal | 3 | 3 | 1 | 2 | | 2 | 3 |
| Instalación y reparación de cercos y corrales | 1 | 1 | | | 1 | 2 | 3 |
| Pisoteo de animales | 4 | 3 | | 2 | 1 | 2 | 3 |
| Trochas y caminos del ganado | 5 | 1 | | 1 | | 1 | 2 |
| Fertilización química (nitrógeno) | 3 | 3 | 2 | 2 | | 2 | 1 |
| Plaguicidas (contra garrapatas, moscas) | 2 | 2 | 1 | | | 1 | 3 |

Cuadro 1. (Continuación)

| | SUELO | AGUA | AIRE | ENERGÍA | BIODIVERSIDAD | | |
|---|--|--|--|--|--|--|--|
| PROCESOS Y PRACTICAS GANADERAS DE PRODUCCION, TRANSPORTACION Y TRANSFORMACION | Compactación, Erosión, Actividad Biológica | Disminución del balance hídrico, Contaminación orgánica y química, Eutrofización | Gases de invernadero, malos olores, Emisión de metano, Hidrocarburos | Irradiación de calor, disminución de fotosíntesis. Uso de combustibles fósiles | Transformación de biomasa terrestres y acuáticos | Pérdida o transformación severa de ecosistemas naturales | Amenaza o extinción de especies de flora y fauna |
| Empaques no biodegradables de insumos y productos | 1 | 3 | 1 | 3 | | | 2 |
| Drogas, medicinas (antibióticos, hormonales y otros) | 2 | 1 | | | | | 2 |
| Transporte terrestre del ganado | 2 | | 2 | 3 | | 1 | 1 |
| Transporte fluvial del ganado | | 3 | 1 | 1 | 1 | | 2 |
| Mataderos de ganado | 2 | 5 | 3 | 3 | | | 1 |
| Plantas procesadoras de lácteos | 2 | 3 | 1 | 3 | | | 1 |
| Industrias procesadoras de pieles | 2 | 5 | 3 | 2 | 1 | 2 | 3 |

Fuente: Murgueitio (1999).

4.3 EFECTOS DE LA FERTILIZACIÓN DE SÍNTESIS QUÍMICA

La alimentación en la ganadería, se realiza en la modalidad de pastoreo debido a que los forrajes constituyen los recursos más abundantes (Sánchez & Villaneda, 2009), la finalidad de la explotación del mismo corresponde a la producción intensiva del sistema aéreo de las plantas, el cual requiere para un óptimo rendimiento diferentes nutrientes en comparación a los requeridos por cualquier otro sistema productivo que tenga como finalidad la producción de frutos, granos etc. (Sierra, 2002), para suplir estos requerimientos se realiza la aplicación de los nutrientes necesarios por la pradera mediante procesos de fertilización (Bernal & Espinosa, 2003).

En general el N, P, K, Ca, Mg y S, son los elementos que más varían en cuanto al requerimiento nutricional en diferentes suelos y especies forrajeras (leguminosas y gramíneas), estos pueden fluctuar a nivel edáfico con el paso del tiempo, debido a la remoción del sistema, reciclaje y a pérdidas como las que se dan por lixiviación y fijación (Sierra, 2002).

El nitrógeno, que es un elemento que está ampliamente distribuido en la naturaleza, en la atmósfera se halla en forma de N₂, con una representación del 78% (Castilla, 2006), siendo este el nutriente que requiere en mayor cantidad la planta, debido a que constituye componentes celulares como aminoácidos y ácidos nucleicos (Taiz & Zeiger, 2006) además de ser un elemento primordial en la molécula de la clorofila (Tislade, Nelson & Beaton, 1985) encontrándose principalmente en las partes jóvenes de la planta en crecimiento (Millar, 1964). Sin embargo, la cantidad del nitrógeno en el suelo es limitada debido a que en

ocasiones su presencia es demasiado soluble y desaparece por lavado de suelo, en ocasiones se volatiliza y en otras es inasimilable por las plantas (Salamanca, 1990).

El fósforo, es uno de los elementos más importantes para el crecimiento de las plantas, participando en el proceso metabólico de transferencia de energía, biosíntesis de las macromoléculas, fotosíntesis, entre otras actividades (Shenoy & Kalagudi, 2005), desafortunadamente este mineral es uno de los menos disponibles y con menor movilidad en los suelos para el uso de las plantas (Takahashi & Anwar, 2007).

Las prácticas de fertilización con productos de síntesis química, expuesto al exceso o mal manejo de los mismos puede terminar en problemáticas ambientales como la acidificación, salinización, toxicidad para las plantas, problemas en la absorción de nutrientes, afectación de la actividad de los microorganismos y la toxicidad de los suelos (Gómez, 2002).

Además, el uso de fertilizantes sobrelleva un costo considerable, pues su producción depende de la energía derivada de los combustibles fósiles y constituye un riesgo potencial de contaminación y eutrofización de las aguas dulces (Castilla, 2006). Para el caso de la fertilización nitrogenada, su abuso ha generado contaminación ambiental y reducción en la fertilidad del suelo (Ferrera & Alarcón, 2007), al igual que contaminación en fuentes hídricas, fenómeno conocido como eutrofización, el cual consiste en el incremento del suministro y la disponibilidad de nutrientes principalmente nitrógeno y fósforo, los cuales desequilibran el estado natural del agua, modificando su funcionamiento y acelerando procesos indeseables (Red de Acción en Plaguicidas y sus Alternativas para América Latina [RAP-AL]. 2010).

Por su parte, las formas solubles de fertilizantes de fósforo aplicados en el suelo se precipitan en formas insolubles, lo cual impide que las plantas lo utilicen efectivamente, siendo consecuencia de ello la aplicación excesiva de este elemento en el suelo (Omar, 1998) incrementando los costos de producción agrícola y provocando una variedad de problemas ambientales (Del Campillo, Zee, & Torrent, 1999). Además, el uso de este fertilizante es costoso, se estima que cerca de 4 billones de dólares anuales son necesarios para satisfacer la necesidad mundial, por lo cual se buscan fuentes alternativas como el uso de microorganismos que incrementen la disponibilidad de fosfatos acumulados en el suelo (Gyaneshwar et al., 2002).

Finalmente, “se considera que el uso de fertilizantes químicos está alcanzando su máximo teórico, más allá del cual a futuro no será posible un incremento en la producción asociada a su uso” (Gyaneshwar et al., 2002).

Concluyendo, las anteriores problemáticas han sido consecuencia de modelos de agricultura química basada en el uso de fertilizantes y pesticidas que han implementado los países industrializados para su producción agrícola, sin

embargo, en Latinoamérica se ha buscado implementar tecnologías que potencialicen la asociación de plantas con microorganismos, por su efecto en la sostenibilidad productiva y ambiental presentándose como una alternativa frente al uso de fertilizantes y plaguicidas de síntesis química que además de ser costosos, presentan un impacto negativo sobre la salud y el medio ambiente (Izaguirre et al., 2007).

4.4 GENERALIDADES DEL PASTO KIKUYO (*Pennisetum clandestinum*)

Es una gramínea de origen africano, la cual se ha adaptado muy bien a las zonas de clima frío en nuestro país, desarrollándose óptimamente entre los 2200 y 3000 msnm. Se clasifica como una especie perenne, con características que incluyen un sistema radicular grueso y profundo que le confiere ser considerada como una gramínea de alta cobertura tolerante a la sequía, sin embargo, con un ineficiente desarrollo en suelos con mal drenaje (Estrada, 2002).

En las regiones alto andinas de Colombia, el Kikuyo se establece como la gramínea más común, siendo esta la principal base alimenticia para la actividad ganadera con fines de producción lechera (Carulla, Cárdenas, & Riveros, 2004), este a su vez participa con el 80% del total de los pastos implementados en las zonas de clima frío del país (Mila & Corredor, 2004).

A nivel de la sabana de Bogotá, cerca de 70.000 ha son ocupadas por praderas de Kikuyo, sin embargo y pese a su gran abundancia, se tienen como consecuencia del manejo inadecuado en la explotación de este pasto, la disminución en la producción del forraje, lo que involucra a su vez el bajo rendimiento de los animales en la producción lechera (Mila & Corredor, 2004).

Otro factor que contribuye al bajo rendimiento en la producción ganadera según Marais (2001) son los componentes nutricionales que presenta el Kikuyo, al existir un deficiente balance entre proteína y energía en esta gramínea, lo que no favorece plenamente la dieta alimenticia de los animales dispuestos para la producción lechera. Por otro lado, algunos autores colocan a *Pennisetum clandestinum* a la par de los pastos tetraploides en cuanto a su valor nutricional y producción, aventajándolo solo en la precocidad (Estrada, 2002).

4.5 GENERALIDADES DEL PASTO RYE GRASS (*Lolium sp*)

Ésta es una gramínea procedente del Mediterráneo, sur de Europa, norte de África y Asia menor (Velásquez, 2009).

Este pasto se desarrolla por lo general en zonas que se encuentran entre los 2000 y 3200 msnm, además crece en casi todos los suelos, sin embargo los mayores rendimientos se dan bajo condiciones adecuadas de drenaje y con altos contenidos de nitrógeno. A diferencia del Kikuyo, el Rye Grass tiene un ciclo vegetativo corto, dentro de sus variedades encontramos algunos que son anuales, otros que pueden durar hasta 18 meses y muy escasos son aquellos que se

establecen como perennes. La utilidad de este pasto se enfoca principalmente para el pastoreo asociado con trébol también puede ser empleado para corte y ensilaje. La mezcla de Rye Grass con alfalfa incrementa la producción lechera en los sistemas de producción ganadera en el territorio colombiano (Estrada, 2002).

Existen diferencias en cuanto a las variedades del Rye Grass, para el tipo bianual, este se caracteriza por desarrollarse en un ciclo corto, presentando un sabor agradable y un alto grado de digestibilidad lo que lo convierte en una gramínea enriquecedora para la dieta alimenticia del ganado (Velásquez, 2009).

El uso del Rye Grass, se implementa especialmente cuando se requiere de una cobertura rápida o disponibilidad de alimento inmediata para los animales. A diferencia del pasto Kikuyo, el Rye Grass posee la ventaja de establecerse de forma rápida aun en suelos pesados y con poco drenaje (Hannaway et al., 1999). La adaptación de este pasto ha sido buena en las zonas andino-tropicales como Colombia, Ecuador, Perú y Bolivia, en altitudes que van desde los 2000 a 3000 msnm (Rocalba S.A, 2005).

4.6 MUNICIPIO DE NEMOCÓN EN LA ACTIVIDAD AGROPECUARIA

La información que se presenta a continuación ha sido tomada de la página oficial del municipio de Nemocón en el documento denominado Control Interno UMATA con subtitulación Plan Local Ambiental Agropecuario.

4.6.1 Ubicación. El municipio de Nemocón se encuentra ubicado a 65 km de Bogotá D.C., en la provincia sabana centro del departamento de Cundinamarca y pertenece a la cuenca alta del río de Bogotá. Dentro de su territorio cuenta con 11 veredas: Agua clara, Astorga, Casablanca, Cerro verde, Checua, La Puerta, Mogua, Oratorio, Patio Bonito, Susatá y Perico.

4.6.2 Condiciones ambientales. Presenta una precipitación que varía de 400 a 900 mm aumentado del norte al sur del municipio, una temperatura entre los 12 a 15 °C y una altitud de 2.585 msnm.

4.6.3 Uso del suelo. El municipio cuenta con una superficie de 9.811 hectáreas distribuidas en: 2421 predios en el área rural correspondientes a un área de 9.750 hectáreas, mientras que en la zona urbana existen 1564 predios con un área de 61,19 hectáreas. Entre los diversos usos que se le dan a la tierra, el más significativo es el pecuario (pastos mejorados y naturales), seguido por el uso forestal, de recreo y paisaje, y finalmente en menor escala cultivos de flores con fines de exportación.

4.6.4 Uso agrícola. En el municipio de Nemocón, predomina la producción de flores actividad que cuenta con 150 hectáreas para este cultivo, bajo cubierta las especies implementadas son: rosa, clavel, mini clavel, astromelia y jitsu. En esta actividad se encuentran vinculadas 20 empresas en las veredas Checua, Susata, Casablanca, Oratorio y Agua Clara. La finalidad de esta producción en su mayoría es para exportación.

4.6.5 Uso pecuario. Dentro del área rural del municipio se evidencia que la actividad dominante es la producción pecuaria al contar con 600 hectáreas en pastos de corte (avena, maíz forrajero), 3.550 hectáreas de pasto Kikuyo, 2500 hectáreas en praderas mejoradas Rye Grass y 50 hectáreas dedicadas al manejo silvopastoril. En cuanto al componente ganadero, se estima que hay 3.611 vacas utilizadas para lechería especializada, 865 animales para lechería tradicional y 300 animales en doble propósito. Las razas que se encuentran generalmente son Holstein, Jersey Arshyre y Normando.

4.7 IMPORTANCIA DE LOS MICROORGANISMOS EN LA INTERACCIÓN SUELO Y PLANTA

El suelo, corresponde a la capa superior de la tierra, que se origina a partir de una formación geológica natural desarrollada bajo condiciones climáticas diversas y distintos materiales de origen, cuya función se basa en soportar la vegetación (Navarro, 2003), este es una mezcla compleja de materiales, que se distribuyen en fases sólidas líquidas y gaseosas, que se encuentran en una variedad de formas físicas y químicas, de esta manera las propiedades y el funcionamiento del suelo como un todo en ecosistemas naturales e intervenidos, está altamente determinada por las propiedades de estos componentes y sus proporciones relativas (Lavelle, 2001).

No son ajenos a este recurso las poblaciones microbianas, las cuales establecen múltiples interacciones entre ellas; la relación raíz-suelo, en donde los microorganismos pueden, no solo afectar el crecimiento vegetal sino que a su vez participan en la calidad del suelo (Pedraza et.al., 2010).

Según Barea, Azcón & Azcón-Aguilar (2005) a la anterior interacción se le ha denominado como rizósfera, la cual se ha transformado en el hábitat de diferentes microorganismos, destacándose principalmente dentro de sus poblaciones las bacterias y los hongos. Los mismos autores afirman que algunos de estos microorganismos, son capaces de asentarse en los tejidos radicales de las plantas a fin de favorecerlas contra el ataque de fitopatógenos o promover su crecimiento vegetal a partir de la disponibilidad de nutrientes limitantes como el fósforo y el nitrógeno.

La calidad del suelo es medida en la productividad y el sostenimiento de la misma, además de las poblaciones microbianas que lo componen, ya que éstas son las encargadas del ciclo de nutrientes y desintoxicación de productos químicos nocivos, entre otros (Altieri & Nicholls, 2004).

En una pequeña fracción de suelo, se encuentran millones de bacterias, cada una de ellas dispuestas para ejercer diferentes funciones metabólicas, las cuales dependen de su estado fisiológico, de su actividad enzimática y la concentración de las mismas, además de otros factores como las propiedades físicoquímicas del suelo y la presencia de otros microorganismos (Bowen & Rovira, 1999).

4.8 BACTERIAS PROMOTORAS DE CRECIMIENTO (BPCV)

Las Bacterias Promotoras de Crecimiento Vegetal (BPCV) corresponden a diferentes géneros y especies (De-Bashan et al., 2007) estas pueden ser de vida libre o asociativa, aerobias, anaerobias o anaerobias facultativas (Rodríguez & Fraga, 1999).

En el caso de las bacterias asociativas se destacan las Rhizobacterias, capaces de estimular el crecimiento vegetal a partir de la producción de sustancias reguladoras de crecimiento (Arshad & Frankenberger, 1977), inducción de resistencia sistémica a patógenos (Van Peer, Niemann, & Schippes, 1991), la inhibición de crecimiento de organismos antagónicos (Utkhede, Koch, & Menzies, 1999) e interacción sinérgica con otros microorganismos del suelo (Bashan, Holguín & Ferrera-Cerrato, 1996).

Las BPCV actúan sobre la planta empleando dos maneras de acción diferentes: directas e indirectas (Ochoa, Pedraza, Martínez & Carreón, 2010). En el primer caso, las bacterias participan en los procesos de crecimiento vegetal empleando varios mecanismos como: la solubilización de fosfatos, producción de hormonas y fijación de nitrógeno. Su influencia en la planta permite la toma de agua y minerales por parte de la misma, mejorando así su desarrollo radicular, incrementando la actividad enzimática o ayudando a otros microorganismos benéficos para que su efecto positivo en la planta aumente (Bashan et al., 1996). En el segundo caso, las bacterias actúan como control biológico encargándose de suprimir de la planta poblaciones de microorganismos no benéficos que impidan su adecuado desarrollo (Loredo et al., 2004), empleando mecanismos como la producción de antibióticos, sideróforos, y la resistencia sistémica adquirida e inducida (Ochoa et al., 2010).

Para el caso de BPCV en gramíneas, las más destacadas pertenecen a los géneros *Azospirillum*, *Azotobacter*, *Klebsiella*, *Pseudomonas* y *Bacillus* (Loredo et al., 2004), aunque otros autores como Bashan et al. (1996), citan también a *Rhizobium* como genero promotor de crecimiento vegetal.

De otra manera, se resaltan algunas condiciones de interés para el caso de las BPCV, por ejemplo: en relación con el desarrollo de la raíz, el éxito de la introducción de las BPCV depende de su establecimiento y persistencia a lo largo de la estación de crecimiento radicular (Schippers, Bakker, & Bakker, 1987) además de otros factores como la disponibilidad de ciertos elementos como el carbono. Para el caso de bacterias aerobias, su elemento indispensable corresponde a la disponibilidad de oxígeno mientras que las bacterias

microaerobias lo requieren en bajas proporciones; los minerales también hacen parte fundamental de la dieta bacteriana pues a su vez demandan molibdeno, hierro, calcio, potasio y magnesio (Loredo et al., 2004).

Así mismo, la rizósfera definida por Arshad & Frankenberger (1977) como el constituyente de un ambiente en el que prevalecen el flujo de compuestos orgánicos, además de consolidarse como el hábitat de microorganismos asociados a raíces, es el lugar en donde se llevan a cabo varios tipos de interacciones como: competencia, amensalismo, predación y parasitismo.

Finalmente, la movilización de las bacterias hacia el sistema radicular de la planta depende en gran medida de la humedad, la disponibilidad de carbono y quimiotaxis; proceso en el que los microorganismos se dirigen hacia la raíz como consecuencia de la concentración de nutrimentos y otros estímulos que emplea la planta para atraerlos (Mandinba, Heulin, Bally, Guckert, & Balandreau, 1986).

4.8.1 *Azospirillum*. Corresponde a la bacteria más estudiada dentro de las BPCV, el establecimiento de la misma aun no puede ser generalizado en cuanto a la respuesta que se reciba por parte de los cultivos, pues aunque se han observado resultados positivos tanto en campo como en condiciones de invernadero, las grandes extensiones de terreno se han convertido en una gran limitante para su manejo, esto como consecuencia de la inexperiencia de los agricultores y las respuestas inesperadas que puedan desarrollarse en el cultivo; lo que constituye una razón suficiente para ser un tema que debe trabajarse e investigarse (De-Bashan et al., 2007).

Históricamente los aislamientos efectuados sobre la misma, se han realizado en diferentes partes del mundo en medio de una diversidad de suelos, climas entre otros. El primer trabajo fue desarrollado por *Beijerincken* Holanda, hallando *Azospirillum* en suelos con características arenosas, deficientes en nitrógeno.

Otro aislamiento reconocido en la historia de *Azospirillum*, se registró en suelos completamente diferentes a los anteriores, la recopilación de esta bacteria se hizo en Indonesia en suelos que se hallaban adheridos a pastos marinos secos, de ahí en adelante ya se efectuaron aislamientos de la misma bacteria en suelos tropicales, subtropicales, templados y árticos (Bilal, Rasul, Arshad, & Malik, 1993).

4.8.2 *Azotobacter*. Las bacterias pertenecientes al género *Azotobacter* sp, se caracterizan por presentar una alta capacidad fijadora de nitrógeno, debido a su asociación de tipo libre que mantiene esta con la planta, la bacteria puede asociarse a diferentes tipos de suelos, aunque su participación se encuentra por lo general en sustratos tropicales; para el caso colombiano se ha identificado la asociación de *Azotobacter* sp en raíces de cultivos como: brócoli, tomate, coliflor y espinaca en los suelos boyacenses (Borda, Pardo, Montaña, & Martínez, 2011).

El modo de acción de estas bacterias para favorecer el crecimiento vegetal especialmente en estado de plántula, se basa en la liberación de ácido indol-

acético (Sarabia, Madrigal, Martínez, & Carreón, 2010), que corresponde a una auxina natural reguladora de crecimiento (Lugtenberg & Kamilova, 2009).

4.8.3 *Rhizobium*. Hace parte del grupo de bacterias gram-negativas que se presentan en el suelo bajo la forma de bacilos, por lo general estos microorganismos actúan con las raíces, estableciendo una relación simbiótica. La invasión de *Rhizobium* sobre los pelos radiculares de la planta propician la formación de nódulos en la misma, siendo estas estructuras de gran importancia, pues es allí donde el nitrógeno molecular es reducido a amonio el cual es tomado por la planta y en beneficio a ello la bacteria recibe diversos nutrientes entre ellos carbohidratos (Lozano, Corredor, Vanegas, Figueroa & Ramírez, 2006).

Este tipo de bacterias, se caracterizan por la capacidad que tienen para promocionar el desarrollo de la planta tanto directa como indirectamente (Santillana, Arellano, & Zúñiga, 2005); cuando estas tienen un modo de acción indirecto, aplican procesos que impiden la acción fúngica sobre el desarrollo y crecimiento de la planta (Hassan, Zargar, & Beigh, 1997), mientras que su influencia directa abarca mecanismos como: la fijación de nitrógeno (Sessitsch, Howieson, Perret, Antoun, & Martínez, 2002), producción de hormonas (Perrine, Rolfe, Hynes & Hocart, 2004) y solubilización de fósforo (Rodríguez & Fraga, 1999).

4.8.4 *Pseudomonas*. Este género es conocido por su capacidad solubilizadora de fosfato (Rodríguez & Fraga, 1999). Además de esto, muchas bacterias pertenecientes a este género, participan como controlador de patógenos, en especial hongos, este mecanismo de acción es posible dada la síntesis de moléculas antifúngicas que las mismas bacterias procesan, sin embargo, existen cepas bacterianas pertenecientes al mismo género que reducen las poblaciones de otras bacterias a partir de acciones como la antibiosis (Whipps, 2001).

Las *Pseudomonas* también son ejemplo de la resistencia que puede llegar a adquirir la planta, pues su participación en asociación con esta aumenta no solo la velocidad sino los niveles de síntesis de fitoalexinas, este grupo de compuestos heterogéneo de bajo peso molecular, pueden ser inducidos a la planta ya sea por moléculas bióticas o abióticas, algunas de estas moléculas corresponden a las glicoproteínas y lípidos que se encuentran en la pared celular de algunos microorganismos como bacterias u hongos que pueden liberar la acción de un inductor como el caso de las endopoligalacturonasa que a su vez da lugar a la activación de otro inductor que está presente en la pared celular de la planta (Anaya, 2003).

4.9 ASPECTOS DE LA INOCULACIÓN DE BACTERIAS

La Inoculación de microorganismos, es una técnica empleada con el fin de favorecer el desarrollo y crecimiento vegetativo; esto contribuye a mejorar los rendimientos de las cosechas y la cantidad de biomasa (Curl & Truelove, 1986), el conocimiento acerca de las diferentes interacciones que presentan los

microorganismos seleccionados e incorporados (inoculantes) es relevante dentro de los criterios de sustentabilidad de éstos (Naiman, Latronico & García de Salamone, 2009).

Por otra parte muchos trabajos han corroborado que los microorganismos presentes en el suelo, en especial aquellos que son de origen nativo sintetizan muchos compuestos favorables para las plantas, un caso particular es el de las fitohormonas las cuales potencializan el crecimiento de las plantas, para ello se han efectuado procesos de inoculación que demuestran ser más efectivas que la propagación exógena de este compuesto en el sistema productivo (Arshad & Frankenberger, 1977).

Es importante tener en cuenta, que la colonización de la raíz es el proceso por el cual las bacterias sobreviven a la inoculación en las semillas y las cuales se multiplicaran en la espermosfera definida por Lynch (1992) como la zona que rodea la semilla en el estado de germinación y en donde los microorganismos inician una alta actividad que influye en el desarrollo de la planta, el incremento de las bacterias en esta zona surge como respuesta a los exudados de la semilla, logrando que éstas se concentren en las raíces (Beauchamp, Dion, Kloepper, & Antoun, 1991).

4.9.1 Inoculación con Azospirillum. Cuando se efectúan procesos de inoculación en las plantas con Azospirillum, la modificación que se presenta en éstas genera una serie de comportamientos vegetales que pueden favorecer o no el rendimiento de las cosechas. Generalmente la relación Azospirillum-planta trae más ventajas que desventajas, dentro de las que se destaca: incremento en el peso seco total, aumento en la tasa de germinación y promoción del desarrollo radicular de la planta (Bashan et al., 1996).

La inoculación de Azospirillum en las plantas provoca la modificación del sistema radicular en las mismas, los efectos de ello varían de acuerdo a la concentración aplicada, de acuerdo a diversas investigaciones se ha establecido que la concentración óptima de colonización de Azospirillum se establece entre 105 y 106 unidades formadoras de colonias por mililitro (UFC/ml) (De-Bashan et al., 2007).

4.9.2 Inoculación de Rhizobium. La inoculación de esta bacteria, se realiza con el fin de permitir que el nitrógeno atmosférico pueda ser utilizado por las plantas, reduciéndolo a formas asimilables para las mismas, como amonio o nitrato, lo que favorece ambientalmente debido a la sustitución de la fertilización nitrogenada (Lozano et. al., 2006).

Para la inoculación de *Rhizobium*, es importante considerar, ciertos parámetros que garanticen la efectividad del proceso como: la inoculación debe llevarse a cabo en la sombra para no exponer a los rizobios a los rayos solares, ya que es uno de los factores ambientales que puede afectar su viabilidad, además de las concentraciones y soluciones que deben llevarse a cabo según sea el caso para

cada región y cultivo, es recomendable que se siembre el mismo día de la inoculación ya sea de forma manual o mecánica (Lozano et. al., 2006).

4.10 BIOFERTILIZANTES

Los biofertilizantes se pueden definir como preparados a base de microorganismos que habitan normalmente en el suelo, estos son capaces de disponer en la planta mediante su actividad biológica, minerales y sustancias para el desarrollo de la misma. Son caracterizados por su eficiencia en fijar nitrógeno, solubilizar fósforo y potencializar diversos nutrientes, o sustancias producidas biológicamente que estimulan el crecimiento y la germinación vegetal (Mantilla & Zumaque, 2008).

Estos biopreparados en el caso de los fijadores asociativos permiten sustituir hasta el 50% del fertilizante nitrogenado, pueden reducir hasta el 80% con el uso de los simbióticos, y los microorganismos solubilizadores de fósforo permiten sustituir hasta el 70% del fertilizante fosfórico. Además de poder incrementar hasta en un 30% los rendimientos en productos agrícolas, por el efecto de las sustancias activas sintetizadas por bacterias fijadoras asociativas y solubilizadoras de fósforo. (Mantilla & Zumaque, 2008).

En los biofertilizantes, los microorganismos que pertenecen a los géneros *Azotobacter* sp, *Azospirillum* sp, y *Pseudomonas* sp, han demostrado incrementos en los rendimientos de los cultivos, ahorro de fertilizantes minerales y la disminución de la contaminación ambiental (Mantilla & Zumaque, 2008). Por ejemplo en un estudio realizado en plantaciones de trigo empleando biofertilizantes comerciales con *Azospirillum brasilense* (Az1 y Az2) y *Pseudomonas fluorescens* (Pf), se encontró que los rendimientos del grano incrementaron en 17, 14 y 19% con los tratamientos Az1, Az2 y Pf respectivamente, en comparación con los testigos sin inoculación ni fertilización (Naiman, Latrónico & Garcia, 2009).

Acerca de investigaciones de biofertilizantes, se destacan los estudios en la Universidad Nacional de México (UNAM) y el Centro de Investigación sobre Fijación de Nitrógeno (CIFN) México, quienes han desarrollado biofertilizantes empleando a *Azospirillum spp*, produciendo altos rendimientos en cosechas de frijol, maíz, cebada, trigo, café y sorgo con incrementos promedio del 26% en los diferentes cultivos comparados con el testigo. En Colombia entidades como la Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria (CORPOICA) y la Universidad Nacional de Colombia trabajan al respecto y han lanzado al mercado productos como Dimazos en los que se ha observado la reducción del 30% en la aplicación de fertilizantes nitrogenados y un aumento en la producción de arroz entre 10-14 % (Mantilla & Zumaque, 2008).

5. HIPÓTESIS

Algunas bacterias asociadas a los suelos del Municipio de Nemocón, Cundinamarca, se desempeñan como promotoras de crecimiento vegetal para el Pasto Kikuyo y Rye Grass en terrenos dispuestos para la ganadería bovina, ventaja que obtienen al ser cepas nativas adaptadas a las condiciones edafoclimáticas propias de la región.

6. MÉTODOS

El proyecto de investigación se encuentra inscrito en la línea de investigación “Protección Ecológica de Cultivos” y se desarrollará como una investigación de tipo científico.

6.1 UBICACIÓN

El estudio se realizó en la finca Caseteja San Luis, lugar en el cual se desarrolla la actividad ganadera con fines de producción lechera. El terreno está ubicado en la vereda Casablanca kilómetro 8 vía Ubaté, en el municipio de Nemocón a 65 km de Bogotá, provincia sabana centro del departamento de Cundinamarca, presenta una altitud de 2.585 msnm, con una precipitación promedio anual de 700 mm y temperaturas entre 12 y 15° C.

6.2 MUESTREO

Después de despejar la superficie con ahoyador y pala, previamente desinfectados, se tomaron en dos transeptos perpendiculares, a 15 cm de profundidad (Valencia, 2010) 15 submuestras al azar en el área de estudio (ICA, 1992), posteriormente, las submuestras fueron homogeneizadas para conformar una muestra compuesta de 1 Kg (Brady & Weil, 1999), que fue transportada en bolsa ziploc al laboratorio de la empresa Siembra Eco S.A.S., almacenándose a 4 °C para su posterior procesamiento.

6.3 PROCESAMIENTO DE MUESTRA

6.3.1 Recuento de bacterias totales en suelo. Se pesaron 10 g del suelo y se adicionaron en 90 ml de solución salina estéril (0.85% de NaCl), la solución fue sometida a una agitación de 100 rpm durante diez minutos. Posteriormente, se realizaron diluciones seriadas de 10^{-4} a 10^{-7} por triplicado, siguiendo la metodología del número más probable NMP, con el objetivo de estimar la cantidad de biomasa microbiana, empleándose la tabla del NMP para serie de tres repeticiones (Valencia, 2010).

6.3.2 Obtención y aislamiento de bacterias solubilizadoras de fosfatos. Para el desarrollo de esta actividad se utilizó como base el tratamiento indicado por (Valero, 2003). El aislamiento de bacterias solubilizadoras de fosfato inorgánico se obtuvo utilizando el medio de cultivo SRS modificado (SRSM) (véase el Anexo A) propuesto por Sundara & Rao (1963), enriquecido con sales de fosfato de calcio y púrpura de bromocresol como indicador de cambio de pH, así: a partir de la muestra de la rizósfera se hicieron diluciones seriadas de 10^{-2} a 10^{-6} de suelo, luego de cada dilución se sembró 0,1mL en cajas petri con medio de cultivo SRS modificado, transcurridos de 5-7 días de la siembra se seleccionaron las colonias bacterianas que crecieron acidificando en medio de cultivo y formando halo de solubilización, indicando actividad solubilizadora de fosfato.

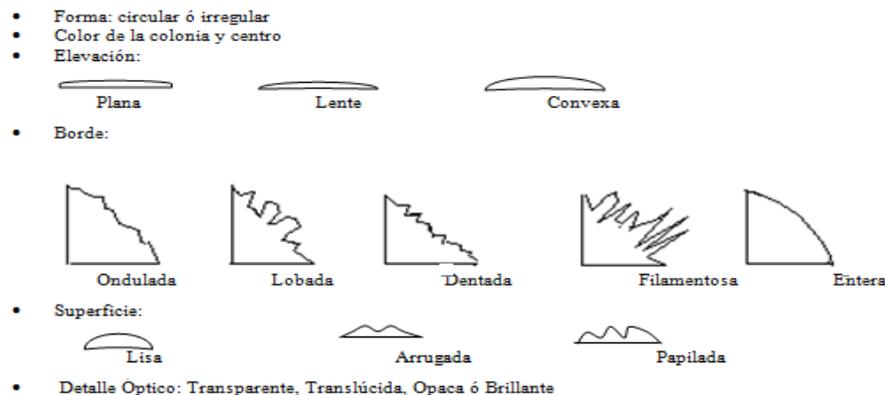
6.3.3 Obtención y aislamiento de bacterias fijadoras de nitrógeno. Siguiendo el tratamiento indicado por Garrido (2007), se realizó, a partir de la muestra del suelo; diluciones seriadas desde 10^{-2} a 10^{-6} , en solución salina estéril (0,85%), posteriormente de cada una de las diluciones se tomó 1 mL en medio de cultivo solido LGI (véase el Anexo B) con 20 gramos de extracto de levadura como fuente de nitrógeno y se incubó a una temperatura de 30 °C durante siete días.

Pasado el tiempo de incubación, se seleccionaron las colonias con características de interés, teniendo en cuenta que las bacterias con capacidad de fijar nitrógeno (N_2) generalmente crecen con producción de mucilago, o con colonias con apariencia traslúcida y consistencia gomosa; también pueden presentar colonias puntiformes (Valencia, 2010). Posteriormente, se realizaron repiques de las mismas en el correspondiente medio de cultivo.

La conservación de los aislamientos de interés, se realizó sembrando los aislamientos en 50 mL de caldo de cultivo DYGS e incubándolos a 30°C a 150rpm durante tres días. Después de su crecimiento se agregó glicerol (30%) al caldo de cultivo y fue dispuesto 1 mL en viales de 1,5 mL y almacenados en un congelador a -20 °C (Garrido, 2007).

6.3.4 Caracterización fenotípica. Para la caracterización fenotípica se tuvieron en cuenta dos aspectos, el primero de ellos correspondió a una identificación macroscópica evaluando la morfología y el crecimiento de las colonias en los medios de cultivo, teniendo en cuenta los parámetros establecidos como: aspecto, color, tamaño, borde, consistencia, forma entre otras (ver figura 1), El segundo aspecto correspondió a la caracterización microscópica empleando la tinción de gram y observando la morfología, agregación, uniformidad de células, tamaño y presencia de estructuras características tales como: gránulos de almacenamiento, esporas, quistes, cápsulas, flagelos entre otros (Teixeira, Solares & Vieira, 2005).

Figura 1. Caracterización morfológica de las colonias



Fuente: Garrido (2007).

6.4 EVALUACIÓN DE LAS BACTERIAS PROMOTORAS DE CRECIMIENTO VEGETAL AISLADAS EN LABORATORIO

6.4.1 Evaluación cualitativa de la actividad Fosfatosolubilizadora. Se determinó la eficiencia relativa de solubilización de los aislamientos, utilizando el índice de solubilización (I.S) según (Premono, Moawad & Vlek, 1996) basado en la medición del diámetro total que se obtiene entre el diámetro de la colonia inicial sumado con el diámetro del halo de solubilización, respecto al diámetro de la colonia (ver figura 2). Los halos de transparencia y/o acidificación que se formaron alrededor de las colonias bacterianas que crecieron en el medio de cultivo SRSM fueron el indicador de la actividad fosfatosolubilizadora.

Figura 2. Índice de solubilización

$$\text{Índice de solubilización} = \frac{D.C \text{ (mm)} + D.H \text{ (mm)}}{D.C \text{ (mm)}}$$

*D.C: diámetro de la colonia, D.H: diámetro del halo de solubilización la colonia. Fuente: Premono et al. (1996)

6.4.2 Determinación de fósforo disponible por la técnica de SPECTROQUANT® (AFM) MERCK. El método Mo- Blue o método del molibdovanadato: Se basa en la determinación del fósforo en solución acuosa, en la formación de ácido fosfoantimolibdeno azul en la presencia de ácido ascórbico (Murphey & Riley, 1962); en solución sulfúrica los iones ortofosfato reaccionan con los iones molibdato, resultando ácido molibdofosfórico, el cual con ácido ascórbico se reduce a azul de fosfomolibdeno, presentando al cabo de cinco minutos una coloración azul, esta prueba se realiza por medio del test de fosfatos SPECTROQUANT® FOSFORO (AFM) MERCK. Es una de las técnicas utilizadas para medir la cantidad de fósforo soluble que se produce en suelo subtropical por las bacterias solubilizadoras de fosfatos (Chen, et al., 2006).

Se inoculó medio SRSM con cada una de las bacterias fosfato solubilizadoras aisladas, el contenido de fósforo soluble, se determinó a las 0, 8 , 14 y 24 horas través del método fosfomolibdeno, utilizando la prueba analítica SPECTROQUANT® FÓSFORO (AFM) MERCK.

Para la preparación de la curva patrón se preparó una solución stock de fosfatos de 180 ppm a partir de ésta solución y con la ecuación $V1 \cdot C1 = V2 \cdot C2$ se determinaron las concentraciones finales de fosfatos las cuáles fueron leídas por duplicado en un espectrofotómetro Spectronic 601 Milton Roy a 712 nm de absorbancia.

Se tomaron 5 mL por duplicado a las 0, 8, 14 y 24 horas, para realizar la lectura del fósforo disponible en el medio de cultivo. Las muestras fueron centrifugadas a 3000 rpm por un periodo de cinco minutos. En un tubo de vidrio se adicionaron 8 mL de agua destilada, 0.5 mL del sobrenadante obtenido a partir de las muestras,

0.5 mL del reactivo A (iones de molibdato en solución sulfúrica) y 0.5 mL del reactivo B (Ácido ascórbico) del Test de fosfatos SPECTROQUANT® FÓSFORO (AFM) MERCK. La absorbancia se leyó en el espectrofotómetro Spectronic 601 Milton Roy a 712nm. La lectura se reportó en partes por millón (ppm) de fosfato soluble, extrapolando las absorbancias a través de la curva patrón.

6.4.3 Síntesis de Ácido Indol Acético. Este procedimiento se realizó para las bacterias fijadoras de nitrógeno, para ello se tomaron los cultivos bacterianos y se realizaron suspensiones celulares ajustadas al tubo N° 5 del patrón de turbidez de Mc Farland. Así mismo, se cuantificó su concentración por recuento de unidades formadoras de colonias (UFC/mL) sobre agar semisólido. El recuento se realizó a las 72 horas y se ajustó la concentración celular con solución salina (0,85% NaCl) hasta obtener 1×10^7 UFC/mL. Posteriormente se inoculó al 2%, 30 mL de caldo Dygs y se incubó durante 48 horas a 32 °C y 120 rpm.

La biomasa obtenida fue sometida a una centrifugación de 8.000 rpm durante 10 min, finalizado el proceso se descartó el sobrenadante, mientras las células se suspendieron en 30 mL de solución buffer fosfato estéril 0,06 M. De esta suspensión celular se tomaron 10 mL y se inocularon en 50 mL de caldo BT modificado, sin solución de vitaminas y con una concentración de 20g/L de triptona como precursor del ácido indolacético y 0,2 g/L de NH_4Cl como fuente de nitrógeno. Luego se incubó en condiciones de oscuridad con una agitación de 120 rpm a 32 °C, durante 48 horas (Radwan, Mohamed & Reis, 2004).

Posteriormente, se centrifugaron 10 mL del caldo microbiano a 8.000 rpm durante 10 min, del cual se tomó 2 mL del sobrenadante y se adicionó 8 mL de reactivo de Salkowsky hasta obtener la coloración que confirmara o descartara la presencia del compuesto indólico. Se realizó la lectura de la absorbancia de las muestras a 535 nm en espectrofotómetro Spectronic 601 Milton Roy. La concentración de ácido indolacético (AIA) se estimó mediante la concentración del compuesto utilizando la ecuación establecida a partir de la regresión lineal hecha a la curva de calibración (véase el Anexo C), construida a partir de diferentes concentraciones de ácido indolacético, AIA (25, 50, 100, 150, 200, 250 y 300 μM) con la adición del reactivo de Salkowsky y leídas a 535 nm en el mismo espectrofotómetro (Kuss, 2006). Para calcular la concentración de AIA producido por mg de células, se determinó el peso seco de las células separadas de los 10 mL de muestra (Radwan et al., 2004).

6.4.4 Identificación molecular por secuenciación parcial de 16s rDNA. Para esta sección se caracterizaron los aislamientos que tuvieron el mejor comportamiento en cuanto a las pruebas de síntesis de Ácido Indol Acético para el caso de las bacterias fijadoras de nitrógeno, y el índice de solubilización y la determinación de fósforo disponible por la técnica de SPECTROQUANT ® MERCK para las bacterias solubilizadoras de fósforo, así:

Los aislamientos seleccionados se cultivaron en 5 ml de caldo LM durante 14 horas en agitación a 150 rpm a 30° C. De esta suspensión se tomaron 25µL en un tubo Eppendorf de 1,5 ml.

El ADN bacteriano fue extraído mediante el uso de DNeasy Blood & Tissue Kit (Qiagen, Alemania) de acuerdo a las instrucciones del fabricante.

La amplificación por PCR del 16S rDNA se realizó a un volumen final de 25 µL de reacción, conformada por un buffer (1x); 2,5 mM de MgCl₂, 0,2 mM de dNTPs, 0,25 U Taq DNA polimerasa (Invitrogen, EE.UU.) y aproximadamente 50 ng de la extracción de ADN molde. El fragmento 16S rRNA fue amplificado con el cebador 27F (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3 ') y el cebador inverso 1492R (5'-GGTTACCTTGTTACGACTT-3').

El ADN se amplificó con un termociclador iCycler (BioRad, EE.UU.) con el siguiente programa: cuatro minutos de denaturación a 95° C, 35 ciclos de 30 segundos de denaturación a 95° C, 30 segundos de anillaje a 57° C, dos minutos de elongación a 72 ° C y 10 minutos de la etapa de extensión a 72° C. Cada mezcla de amplificación (2µL) fue analizada mediante electroforesis en un gel de agarosa (1,5% w/v), con buffer TAE (0,04 M Tris acetato, 0,001 M EDTA) que contenía 1 mg /1 ml (w/v) con bromuro de etidio. (véase los Anexos D y E).

El ADN amplificado fue purificado utilizando el PureLink™ rápida Gel Extraction Kit (Invitrogen, EE.UU.) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. La secuenciación automatizada de los productos de PCR purificado se realizó utilizando el Big Dye Terminator ciclo de secuenciación kit y el ABI secuenciador de ADN 310 (Applied Biosystems, Foster City, CA) el cual es utilizado para llevar a cabo la secuenciación automática de fragmentos de DNA marcados con fluorocromos. Las secuencias obtenidas, fueron comparadas con las secuencias que han sido introducidas en la base de datos National Center of Biotechnology Information (NCBI - <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) para realizar un análisis "Basical Local Alignment Search Tool" para nucleótidos (BLASTn).

6.4.5 Curva de crecimiento de los aislamientos seleccionados. La metodología desarrollada para este proceso, fue la sugerida por Bobadilla y Rincón (2008). Para ello se inoculo el raspado tomado de la caja de Petri con la colonia C16 y por separado el raspado de la colonia A15 totalmente puras, en dos Erlenmeyer de 500 mL, el primero con caldo SMSR estéril sin indicador (Purpura de bromocresol) y el segundo con caldo LGI para las colonias C16 y A15 respectivamente. Posteriormente las mezclas fueron sometidas a una agitación de 120 rpm, expuesta a una temperatura de 28 ° C, durante 24 horas de fermentación.

Para establecer la curva de crecimiento de las colonias C-16 y A15, se tomaron muestras de 1mL a las 0, 3, 6, 9, 12, 15, 18, 21 y 24 horas, siendo 9 mL el total de volumen extraído de la mezcla. En cada uno de los tiempos de muestreo, se hicieron por triplicado recuentos en placa por la técnica de la microgota (Doyle, Beuchat & Montville, 2001), sembrando 20 µL de las diluciones seriadas de 10⁻⁴

hasta 10^{-7} en los medios SRSM solido con purpura de bromocresol para C-16 y LGI para A-15, incubándose a 28 – 30°C durante dos días. Finalmente se realizó el cálculo de las unidades formadoras de colonia sobre mL (UFC/mL) promediando el número de colonias multiplicadas por el factor de corrección (50) y por el correspondiente factor de dilución.

6.5 EVALUACIÓN EN CAMPO

El experimento se desarrolló en la finca Caseteja, San Luis en el lote en el lote N° 3 en un área de 400 m².

La preparación del terreno fue hecha de acuerdo al manejo habitual de la finca con rotovalor y pase de cuchilla recta, posteriormente, el lote fue dividido en 28 unidades experimentales cada una con un área de 6 m² (2X3), en la cuales se realizó la siembra al voleo de la semilla del pasto Rye Grass Sabana, colocando 31 gr de semilla por unidad experimental, mientras que el pasto kikuyo crece habitualmente al ser una gramínea dominante en el terreno.

Las inoculaciones se realizaron a partir de los aislamientos bacterianos que presentaron los mejores resultados en cuanto a solubilización de fósforo y producción de AIA. La aplicación del insumo se realizó directamente sobre el surco (Bashan, 1998), teniendo en cuenta que el objetivo de esta investigación fue la evaluación en la promoción del crecimiento vegetal de los inoculantes bacterianos en una pradera compuesta por los pastos Kikuyo y Rye Grass. La concentración del insumo correspondió a 10^7 UFC como es manejado en la empresa Siembra eco S.A.S. La frecuencia de aplicación para cada uno de los tratamientos experimentados en campo, se realizó de acuerdo a los parámetros de fertilización establecidos en la finca Caseteja San Luis, empleando como fertilizante nitrogenado el 38-8-8 y como fertilizante fosfatado el 27-5-2, con tres tiempos de aplicación: 15 , 35 y 45 días después del establecimiento de la pradera.

Para el experimento en campo se realizó un diseño completamente al azar (DCA), conformado por siete tratamientos con cuatro repeticiones, establecidos de la siguiente forma:

- T1:** Testigo absoluto, sin fertilización de síntesis y/o biológicas.
- T2:** Testigo convencional, fertilización realizada en la finca Caseteja San Luis
- T3:** Inóculo cepa fijadora de nitrógeno.
- T4:** Inóculo cepa solubilizadora de fósforo.
- T5:** Inóculo cepa fijadora de nitrógeno + Fertilizante fosfatado (27-5-2)).
- T6:** Inóculo cepa solubilizadora de fósforo + Fertilizante nitrogenado (38-8-8)).
- T7:** Inóculo de la cepa solubilizadora de fósforo + Inóculo de cepa fijadora de nitrógeno.

En campo cada uno de los tratamientos citados anteriormente, fueron aleatorizados en 28 unidades experimentales (U.E) (ver figura 3).

Figura 3. Distribución de las unidades experimentales

| | | | | | | |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| T 7 | T 3 | T 5 | T 7 | T 3 | T 5 | T 5 |
| T 4 | T 6 | T 2 | T 2 | T 1 | T 5 | T 3 |
| T 6 | T 6 | T 2 | T 4 | T 4 | T 7 | T 1 |
| T 4 | T 2 | T 1 | T 6 | T 1 | T 7 | T 3 |

Fuente: Autores

Finalmente, los tratamientos propuestos fueron evaluados 90 días después de la siembra, para ello se realizó un muestreo destructivo en cada una de las unidades experimentales así: primero se contrarrestó el efecto de bordes, retirando el área de 50 cm a lo largo y ancho de cada unidad experimental (Rosselló & Fernández, 1993). Posteriormente, dentro del área útil de las unidades experimentales se tomó el 10% del total de la unidad experimental y se evaluaron las variables biométricas: peso fresco (PF), peso seco (PS) (Criollo, Obando, Sánchez & Bonilla, 2012) y porcentaje de materia seca (%MS) de la parte aérea y radicular. (Ver figura 4).

Para la determinación del porcentaje de materia seca (MS%) se utilizó la fórmula propuesta por Banziger, Edmeades y Bolaños (1997) (ver figura 4).

Figura 4. Porcentaje de materia seca

$$\%M.S = \frac{100 \times PESO FRESCO}{PESO SECO}$$

Fuente: Banziger, Edmeades & Bolaños, (1997)

6.5.1 Análisis Estadístico. Las variables utilizadas correspondieron al Peso fresco (PF), Peso Seco (PS) y porcentaje de Materia Seca (%MS) de la parte aérea y radicular de cada uno de los tratamientos evaluados en campo.

Los datos obtenidos fueron analizados con el software estadístico SPSS (Statistical Package for the Social Sciences) utilizando un nivel de significancia de 0.05 (95%). Para verificar la distribución normal de los datos de cada variable se empleó la prueba de Shapiro-wilk, la homogeneidad de varianzas se obtuvo a través de la prueba de Levene y el análisis de varianza se desarrolló con la prueba de ANDEVA de un factor.

7. PRESENTACIÓN Y DISCUSIÓN DE LOS RESULTADOS

7.1 PROCESAMIENTO DE LA MUESTRA

7.1.1 Recuento de bacterias totales en el suelo. A continuación se presentan los resultados obtenidos en esta prueba (ver Tabla 1)

Tabla 1. Estimación del NMP para cada una de las tres muestras evaluadas.

| Muestra de suelo | Valores por crecimiento de diluciones | | | | Código | Numero probable | UFC |
|------------------|---------------------------------------|------------------|------------------|------------------|--------|-----------------|---------|
| | 10 ⁻⁴ | 10 ⁻⁵ | 10 ⁻⁶ | 10 ⁻⁷ | | | |
| Muestra suelo 1 | 3 | 3 | 3 | 0 | 3 3 0 | 25.0 | 250.000 |
| Muestra suelo 2 | 2 | 2 | 2 | 1 | 2 2 2 | 3.5 | 3.500 |
| Muestra suelo 3 | 3 | 0 | 0 | 0 | 3 0 0 | 2.5 | 2.500 |

Fuente: Autores

Los datos de la Tabla 1, indican la cantidad de Unidades Formadoras de Colonia (UFC) obtenidas para cada una de las tres muestras evaluadas en el suelo donde se desarrolló la experimentación en campo.

La muestra de suelo 1 obtuvo la cantidad más alta de UFC, que de acuerdo con las observaciones hechas por Uribe (1999), está en el rango de los valores normales de población bacteriana que debe existir en un suelo con características productivas y fértiles, estimado de $1 \times 10^3 - 1 \times 10^5$ UFC/g de suelo.

La cantidad de población de microorganismos en el suelo, constituye uno de los parámetros que indica la calidad del mismo debido a la susceptibilidad que tienen los mismos frente a los cambios que se generan por su uso (Cerón y Melgarejo, 2005). Por otra parte, las bacterias representan entre el 25 y 30% de la biomasa microbiana del suelo, siendo estos los microorganismos más numerosos en el sustrato (Alfonso, Coca, Ramirez & Hoyos, 2008).

7.1.2 Obtención y aislamiento de bacterias solubilizadoras de fosfatos. Se obtuvieron tres aislamientos, registrados como: C7, C12 y C16, los cuales presentaron solubilización y/o acidificación en el medio SRSM (Ver figura 7).

7.1.3 Obtención y aislamiento de bacterias fijadoras de nitrógeno. Se obtuvieron 18 aislamientos que cumplieron con algunas de las características morfológicas sugeridas por Valencia (2010), estas fueron registrados como: A1, A2, A3, hasta A18. Posteriormente se realizó la purificación de los mismos, descartando aquellos que mostraron un crecimiento lento o nulo en comparación a los demás. Finalmente, fueron seleccionaron cuatro aislamientos que

corresponden a los registrados como: A2, A7, A15 y A18, con los cuales se continuo el proceso en medio LGI (ver figura 5).

Figura 5. Medios de cultivo utilizados para los aislamientos



* A la derecha medio de cultivo SRSM sin purpura de bromocresol, a la izquierda medio de cultivo LGI. Fuente: Autores.

7.1.4 Caracterización fenotípica. A continuación, se presenta la descripción microscópica y macroscópica para los tres aislamientos: C7, C12 y C16, obtenidos como fosfato solubilizadores.

Tabla 2. Caracterización fenotípica de los aislamientos fosfato solubilizadores.

| Aislamiento | Caracterización Microscópica | Caracterización Macroscópica |
|-------------|------------------------------|--|
| C 7 | Bacilos gram negativos | Colonias circulares, brillantes, amarillas, convexas, borde ondulado, superficie lisa. |
| C 12 | Bacilos gram negativos | Colonias circulares, amarillo quemado, convexas, borde ondulado, superficie arrugada. |
| C 16 | Bacilos gram negativos | Colonias circulares, amarillo quemado, planas, borde liso, superficie plana. |

Fuente: Autores.

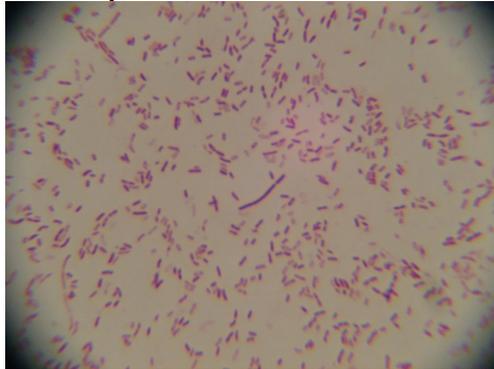
Los tres aislamientos encontrados corresponden a bacilos gram negativos (ver Tabla 2). En trabajos relacionados, autores como Lara, Ávila & Negrete (2011), reportan que el (93%) de los aislamientos obtenidos en su trabajo correspondieron a bacilos gram negativos, (5%) bacilos gram positivos y (2%) a cocos gram positivos. Valero (2003) menciona que en su estudio predominaron las formas bacilares gram negativas al igual que Useche, Valencia & Pérez (2004). Con lo anterior se puede evidenciar que la forma microscópica más abundante para el caso de las bacterias solubilizadoras de fósforo reportadas es bacilar gram negativa.

En cuanto a la morfología de las colonias, Gulati, Rahi & Vyas (2008) reportan que de los aislamientos obtenidos en su estudio las características macroscópicas son alternas y van desde circular plana a convexa o elevada, con márgenes enteras u onduladas, por su parte Sharma, Kumar & Tripathi (2011) encontraron características como colonias incoloras y blancas, viscosas con márgenes irregulares. Esta diferencia de morfologías se puede deber a que los aislamientos

obtenidos en cada uno de los estudios correspondan a diferentes géneros bacterianos que desarrollan sus propias características fenotípicas en los diferentes medios de cultivo utilizados para su aislamiento.

A continuación, se muestra la caracterización microscópica obtenida para el aislamiento C16, en la que se evidencian formas bacilares gram negativas (ver Figura 6).

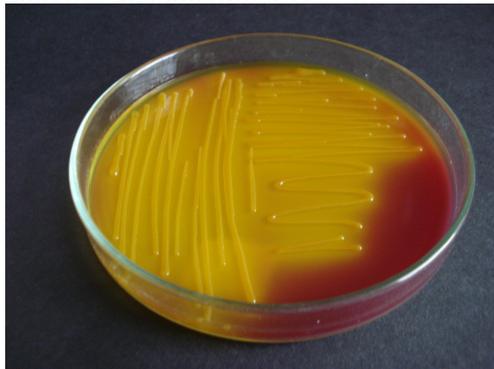
Figura 6. Caracterización microscópica aislamiento C16.



Fuente: Autores

En la siguiente imagen (ver Figura 7) se muestra el aislamiento registrado como C16, en medio de cultivo SRSM y sembrado por la técnica de agotamiento

Figura 7. Siembra por agotamiento aislamiento C16



*El cambio de color de purpura a amarillo indica actividad fosfato solubilizadora
Fuente: Autores

Por otra parte, se indica la descripción microscópica y macroscópica de los cuatro aislamientos preseleccionados, fijadores de nitrógeno, registrados como: A 2, A 7, A 15 y A 18 (ver Tabla 3).

Tabla 3. Caracterización fenotípica de los aislamientos fijadores de nitrógeno.

| Aislamiento | Caracterización Microscópica | Caracterización Macroscópica |
|-------------|------------------------------|--|
| A 2 | Bacilos gram negativos | Colonias circulares, transparentes, convexas, borde liso, superficie lisa. acidifica |
| A 7 | Bacilos gram negativos | Colonias circulares, blancas, convexas, borde liso, superficie lisa. |
| A 15 | Bacillos gram negativos | Colonias circulares, opacas, planas, borde ondulado, superficie lisa. |
| A 18 | Bacilos gram negativos | Colonias circulares, trasparente, convexa, borde ondulado, superficie lisa. |

Fuente: Autores.

De acuerdo a la caracterización macroscópica obtenida para la cepa A15, cuyo aislamiento fue seleccionado para aplicar en campo, se observó una estrecha relación con la descripción morfológica proporcionada por Jiménez (2007) y Aycaya (2012) para las bacterias del genero *Azotobacter* sp , en el que coincide con la cepa de estudio, debido a la presencia de colonias con aspecto viscoso, elevación plana o convexa, superficie lisa o arrugada y bordes ondulados, además de la obtenida por Borda et al. (2009) presentando colonias de forma irregular y bacilar corta, acompañada con la formación de quistes en algunos casos, con tinción gran negativa; en cuanto a la pigmentación, esta puede variar según el medio de cultivo en el que se esté realizando el aislamiento, por lo que puede ir desde diferentes matices pardos Rubenchik (citado por González, 2000) hasta la obtención de colonias blancuzcas, mucosas y de aspecto brillante (Rubio, 2011).

A continuación, se presenta la caracterización microscópica obtenida para el aislamiento A15 (ver Figura 8).

Figura 8. Caracterización microscópica aislamiento A15



Fuente: Autores

A continuación, se evidencia el aislamiento A15 en medio de cultivo LGI, empleando la técnica de siembra por agotamiento (ver Figura 9).

Figura 9. Siembra por agotamiento aislamiento A15

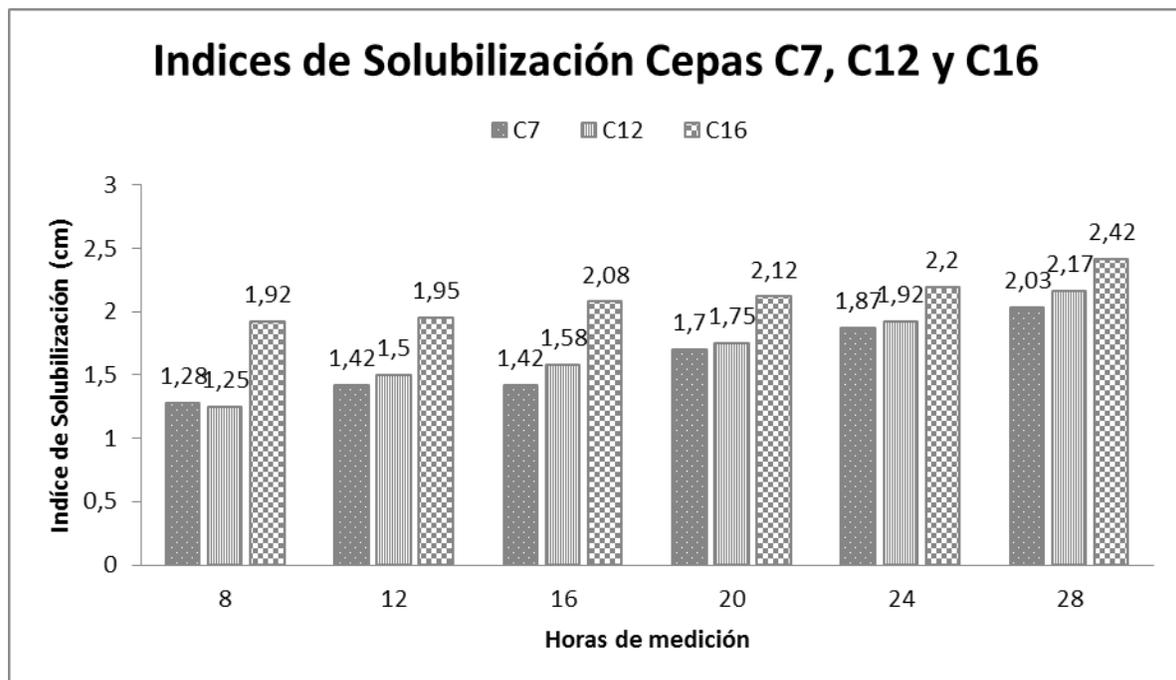


Fuente: Autores

7.2 EVALUACIÓN DE LAS BACTERIAS PROMOTORAS DE CRECIMIENTO VEGETAL AISLADAS EN LABORATORIO

7.2.1 Evaluación cualitativa de la actividad fosfato solubilizadora. Se determinó el índice de solubilización (I.S) de los aislamientos C7, C12 y C16, con el objetivo de tener un criterio comparativo para la selección de la cepa más eficiente. (Ver Gráfica 1)

Gráfica 1. Índices de solubilización obtenidos por los aislamientos solubilizadores.



Fuente: Autores.

De acuerdo con la gráfica 1, los datos estimados para el índice de solubilización, muestran que el mejor desempeño en relación al tiempo de medición corresponde a la cepa C16, la cual supera los índices obtenidos por C7 y C12, presentando en las primeras ocho horas un índice de 1.92 que aumentó a 2.42 transcurridas las 28 horas de medición, seguida de la cepa C12, con un índice inicial de 1.25, finalizando en 2.17; por último se encuentra la cepa C7, con el menor índice, aunque a las 8 horas iniciales tuvo un índice de 1.28, superior al de la cepa C12, el índice final para esta cepa fue de 2.03 (ver gráfica 1). Autores como Lara et al. (2011), observaron que para algunas cepas solubilizadoras de fosfato, los intervalos de tiempo son importantes al permitir el aumento de tamaño del halo total, como sucedió con las cepas C16 y C12. Sin embargo, se puede presentar el caso contrario, en donde la formación del halo total se detiene, observándose índices de solubilización bajos, aunque no fue el caso para la cepa C7, se resalta el hecho de que en comparación con las cepas C16 y C12, la formación del halo total no fue continuo de la hora 12 hasta la 16.

En cuanto a los valores de índice de solubilización, autores como Valero (2003) reportan índices entre 1.0 - 1.75; Becerra et al. (2011) entre 1.6 – 3.0; Lara et al. (2011) entre 1.5 – 4.2. Al comparar éstos resultados con los índices obtenidos en el presente trabajo, se observa que se encuentran en el rango de solubilización reportados y según Otálora, Patiño, Martínez & Pedroza (2003), los índices obtenidos son considerados como aceptables. Finalmente es importante tener presente que el índice de solubilización es influenciado por el tipo de microorganismo aislado, por ejemplo: miembros del género *Serratia* tienen una mejor actividad fosfato solubilizadora en comparación con otros géneros como *Bacillus* (Beltrán, Torrado, Martínez & Matiz, 2005).

Por otra parte, la presencia de halo alrededor de las colonias (Ver figura 10) se debe a la producción de ácidos orgánicos que solubilizan el fósforo; sin embargo, se aclara que muchos microorganismos que no presentan halo, tienen la capacidad de disolver elevadas concentraciones de fósforo, lo anterior se debe a que la producción de ácido no es la única explicación en la solubilización de fosfatos inorgánicos insolubles Gyaneshwar et al. (Citado por Martínez & Garcia, 2010), sin embargo es el mecanismo más relevante para tal proceso (Gyaneshwar et al., 2002).

Los ácidos orgánicos tienen la capacidad de incrementar la disponibilidad del fósforo empleando mecanismos como: acidificación de la rizosfera de la planta, la capacidad de formar complejos estables con Al y Fe, además los ácidos orgánicos pueden incrementar la disponibilidad de micronutrientes como el Fe, Zn Y Mn en el suelo al disminuir el pH en la rizosfera, o por la quelación de estos micronutrientes, así mismo estos ácidos en el suelo participan en fenómenos como la quimiotaxis microbiana y detoxificación de metales (Paredes & Espinoza, 2010).

Finalmente, dentro de los ácidos orgánicos reportados en la solubilización de fósforo tenemos al acetato, lactato, oxalato, tartrato, succinato, citrato, gluconato, cetogluconato, glicolato, entre otros (Gyaneshwar et al., 2002), producidos por géneros bacterianos reportados como: Pseudomonas, Rhizobium, Burkholderia, Achromobacter, Agrobacterium, Aereobacter, Flavobacterium, Yarowia, Streptosporangium y Erwinia (Paredes & Espinosa, 2010).

Figura 10. Halo de solubilización aislamiento C16



Fuente: Autores

7.2.2 Determinación del fósforo disponible por la técnica de SPECTROQUANT® (AFM) MERCK. El contenido de fósforo soluble se cuantificó a través del método de fosfomolibdeno, utilizando la prueba analítica SPECTROQUANT® FÓSFORO (AFM) MERCK a las 0, 8, 14 y 24 horas de fermentación, para cada uno de los aislamientos.

A continuación, se indica la determinación de fósforo disponible para la cepa C7, a partir de los diferentes tiempos de fermentación evaluados a las 0, 8, 14 y 24 horas. (ver Tabla 5).

Tabla 4. Determinación de fósforo disponible cepa C7.

| Tiempo de fermentación | Fósforo disponible (ppm) | Biomasa (Log UFC/mL) |
|------------------------|--------------------------|----------------------|
| 0 | 4 | 7,012 |
| 8 | 7,31 | 6,43 |
| 14 | 18 | 8,49 |
| 24 | 15,14 | 5 |

Fuente: Autores.

Por otra parte, se registra la cantidad de fósforo disponible para la cepa C12, a partir de diferentes tiempos de fermentación correspondientes a las 0, 8, 14 y 24 horas (ver Tabla 6).

Tabla 5. Determinación de fósforo disponible cepa C12.

| Tiempo de fermentación | Fósforo disponible (ppm) | Biomasa (Log UFC/mL) |
|------------------------|--------------------------|----------------------|
| 0 | 5,87 | 7,65 |
| 8 | 8,63 | 7,52 |

| | | |
|----|------|------|
| 14 | 20,1 | 8,89 |
| 24 | 17,4 | 5,55 |

Fuente: Autores.

Finalmente, se indica la determinación de fósforo disponible correspondiente a la cepa de estudio C16 (ver Tabla 7).

Tabla 6. Determinación de fósforo disponible cepa C16.

| Tiempo de fermentación | Fósforo disponible (ppm) | Biomasa (Log UFC/mL) |
|------------------------|--------------------------|----------------------|
| 0 | 7,3 | 8,4 |
| 8 | 11,3 | 10,3 |
| 14 | 22,5 | 12,9 |
| 24 | 19 | 10 |

Fuente: Autores.

En general, el fósforo disponible en cada una de las cepas evaluadas C7, C12 y C16, aumentó progresivamente hasta la hora 14, en donde se obtiene el resultado más alto, según Bobadilla & Rincón (2008) esto se debe a la mayor cantidad de biomasa microbiana que se relaciona directamente con una mayor actividad fosfatasa.

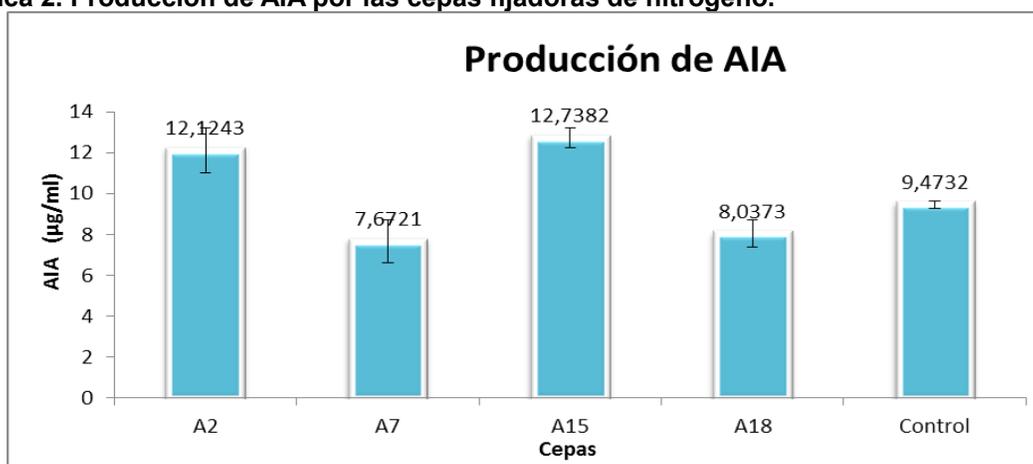
Por su parte la cepa C16 fue la que presentó el mejor resultado, obteniendo a las 14 horas 22,5 ppm de fósforo disponible en un volumen correspondiente a 5 mL, en comparación con C12 que obtuvo en el mismo tiempo 20,1 ppm y C7 con 18 ppm. Al comparar estos resultados con los obtenidos en la prueba de índice de solubilización, se resalta que al igual que en el caso anterior, la mejor respuesta fue obtenida por la cepa C16 seguida de las cepas C12 y C7, respectivamente.

En cuanto a valores obtenidos de disponibilidad de fósforo, autores como: Anandham et al. (2007) reportaron que para los aislamientos adquiridos en su trabajo registraron valores que oscilaron entre: 216.08 µg/mL para *Enterobacter aurogenes* y 363.78 µg/mL para *Burkholderia* sp; Gulati et al. (2008) registran valores entre 1.4 µg/mL y 805.0 µg/mL para *Pseudomonas fluorescens* BIHB 751 y BIHB 752 respectivamente; Chang & Yang (2009) reportan valores entre 2,6 µg/mL para *A. fumigatus* y 544,2 µg/mL para *B. Smithii* F18. En el presente trabajo el máximo valor alcanzado fue obtenido por el aislamiento C16 con 22,5 ppm equivalentes a 27 µg/mL, resultado que se encuentra entre los valores mínimos reportados por los autores anteriormente citados. La marcada diferencia entre los resultados obtenidos podrían deberse a factores como: diferentes medios de cultivo utilizados al igual que las temperaturas empleadas en cada trabajo, por ejemplo: en el trabajo realizado por Gulati et al. (2008) la disponibilidad de fósforo vario de 805.0 µg/mL en medio TPC (fósforo tricálcico) a 6 µg/mL en medio MRP (Roca fosfórica musoorie) utilizando a *Pseudomonas fluorescens* BIHB 752. Por su parte Chang & Yang (2009) empleando a *B. Smithii* F18, obtuvieron 544,2 µg/mL a 50 °C mientras que con 25 °C 7,3 µg/mL.

Finalmente Gaur (citado por Gulati et al, 2008) sugiere que la solubilización de fosfatos dependerá de la complejidad estructural y el tamaño de las partículas, al igual que la naturaleza y cantidad de compuestos orgánicos generados por los microorganismos.

7.2.3 Síntesis de ácido indol acético. A continuación, la Gráfica 1 muestra la cantidad de Ácido Indol Acético sintetizado por cada uno de los 4 aislamientos preseleccionados. Los resultados obtenidos sugieren que las cepas con menor producción de AIA corresponden a la A7 con 7.6721 $\mu\text{g}/\text{mL}$ y A18 con 8.0373 $\mu\text{g}/\text{mL}$ con una diferencia de 0.3652 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Por otra parte, los aislamientos A2 y A15 arrojaron los valores más altos con cantidades de 12.1243 $\mu\text{g}/\text{mL}$ y 12.7382 $\mu\text{g}/\text{mL}$ respectivamente, demostrando una alta capacidad de producción de ésta auxina, la cual favorece y promueve el crecimiento vegetal, como lo afirma Glick et al. (Citado por Shoebitz, 2006). Finalmente la cepa de control correspondiente a *Azotobacter chroococum* presente en la prueba de AIA se mantuvo en un rango medio, al arrojar un valor de 9.4732 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (ver Gráfica 2).

Gráfica 2. Producción de AIA por las cepas fijadoras de nitrógeno.



Fuente: Autores

Los datos obtenidos en este estudio concuerdan con los de Escobar, Horna, Carreño & Mendoza. (2011), que ubica la capacidad de producción de este compuesto por parte de las bacterias del genero *Azotobacter* sp entre un rango de 7.10 y 57.99 $\mu\text{g}/\text{mL}$ para diversos cultivos de hortalizas y superan lo encontrado por Lara, Oviedo & Betancur (2011), en cuyo trabajo, la cepa de *Azotobacter* sintetizo 3.164 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de AIA.

Así mismo, los valores encontrados son similares a los de Zaid, El-Diasty, El-Rhman & El-Sanossy (2009), quien obtuvo rangos de producción de AIA entre 4.35 y 20.39 $\mu\text{g}/\text{mL}$ para *Azotobacter chroococum* sometida en medio con triptófano a partir de la conjugación de dos cepas de la misma especie bacteriana que resultó en 12 recombinaciones con producción de AIA establecidos entre los rangos anteriores.

La capacidad que tiene una bacteria para producir o sintetizar AIA, se traduce en una de las características fundamentales de las BPCV, dado que ésta fitohormona promueve la formación de raíces y desarrollo de pelos radiculares, que conlleva a una mayor absorción de agua y minerales del suelo (Caballero, 2006). También es definido como la auxina natural más frecuente e importante en las plantas que puede ser sintetizada por microorganismos que según Patten & Glick (1996) pertenecen principalmente a los géneros de *Azotobacter*, *Pseudomonas*, *Rhizobium* y *Azospirillum*. Por otra parte, autores como Tsavkelova et al. (2006) atribuyen como mecanismo importante dentro del desarrollo vegetal la acción del AIA en la formación de órganos vegetales, dominios apicales y diferenciación vascular de las plantas a lo que Lugtenberg & Kamilova (2009) añaden que géneros bacterianos como *Pseudomonas sp*, *Bacillus sp* y *Azotobacter sp* reportados por Ahmad, Ahmad & Khan (2006) como los principales productores de AIA; liberan éste compuesto en la rizósfera de las plantas, considerándose un efecto estimulador del crecimiento de las mismas, especialmente cuando se encuentran en estado de plántula. Por su parte Zhao (2010) confirma que el AIA, es la principal auxina de las plantas y es una de las fitohormonas de mayor relevancia dado que regula muchos aspectos del crecimiento y el desarrollo vegetal como la división, la elongación y diferenciación celular.

7.2.4 Identificación molecular por secuenciación parcial de 16s rDNA. La comparación de las secuencias obtenidas con las registradas en la base de datos del NCBI reveló que el aislamiento A15 se acercó con un porcentaje del 96% de identidad con la secuencia de *Azotobacter sp* (véase Anexo F) y la cepa C16 presentó un porcentaje del 96% de identidad con la secuencia *Pseudomonas sp* (véase Anexo G) corroborando la afirmación hecha por Bagwell, Piceno, Ashbourne & Lovell (1998) al deducir que las principales bacterias asociadas a las gramíneas corresponden a *Pseudomonas sp* y *Azotobacter sp*.

Kennedy, Rudnick, MacDonald & Melton (2005) sugieren que el género bacteriano *Azotobacter spp* está conformado por siete especies: *Azotobacter chroococcum*, *A. vinelandii*, *A. beijerinckii*, *A. paspali*, *A. armeniacus*, *A. nigricans* y *A. salinestris*. Su etimología, según lo descrito por Hernández, Pereira & Tang (1994), deriva de la palabra francesa “asoto” que traduce nitrógeno y “bacter” termino griego que significa bacilo.

Azotobacter, es un género bacteriano que, según Dibut & Martínez (2006), ha representado mayor campo de estudio, dada su participación dentro del grupo de bacterias promotoras de crecimiento vegetal, por su capacidad de producir sustancias como auxinas, giberelinas, citoquininas entre otras que favorecen el desarrollo vegetal Lara, Oviedo & Betancur (2011), además de ser considerado como eficiente en la fijación asimbiótica de nitrógeno.

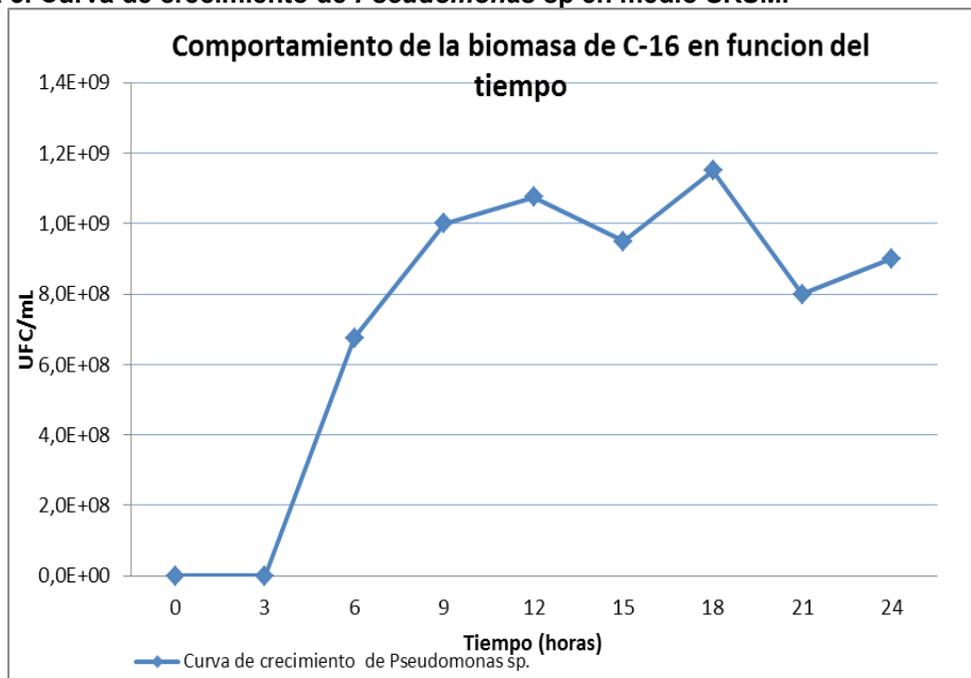
Azotobacter sp, al igual que otros microorganismos posee estructuras de resistencia que le permiten sobrevivir ante condiciones de estrés como la sequía o deficiencia de algunos nutrientes, estudios realizados por Elmerich, Zimmer & Vieille (1992) sugieren que este género bacteriano posee la capacidad de

enquistarse a lo que Senior & Dawes citado por Loredo et al. 2001) atribuyen que la formación del quiste se debe a condiciones escasas de oxígeno y de humedad, mientras que la cantidad de carbono es elevada.

Por su parte, *Pseudomonas* sp es un género bacteriano ubicuo de los suelos agrícolas y presentan diferentes características que las ubican como promotoras de crecimiento vegetal (Saharan & Nerha, 2011), entre estas encontramos: el control biológico, utilizando mecanismos como la producción de metabolitos antimicrobianos que permiten manejar hongos fitopatógenos (Villas, Frías & Gonzalez, 2005). También el género *Pseudomonas* sp produce y segrega reguladores de crecimiento como auxinas, giberelinas y citoquininas que permiten mejorar procesos como: nutrición mineral, germinación de semillas, empleo de agua y desarrollo de raíces entre otras Pan et al. citado por Santillana, 2006), finalmente, este género se destaca por su habilidad de solubilizar fósforo (Rodriguez y Fraga, 1999).

7.2.5 Curva de crecimiento de los aislamientos seleccionados. A continuación se evidencia el comportamiento presentado por *Pseudomonas* sp (ver Gráfica 2) y *Azotobacter* sp (ver Gráfica 3)

Gráfica 3. Curva de crecimiento de *Pseudomonas* sp en medio SRSM.



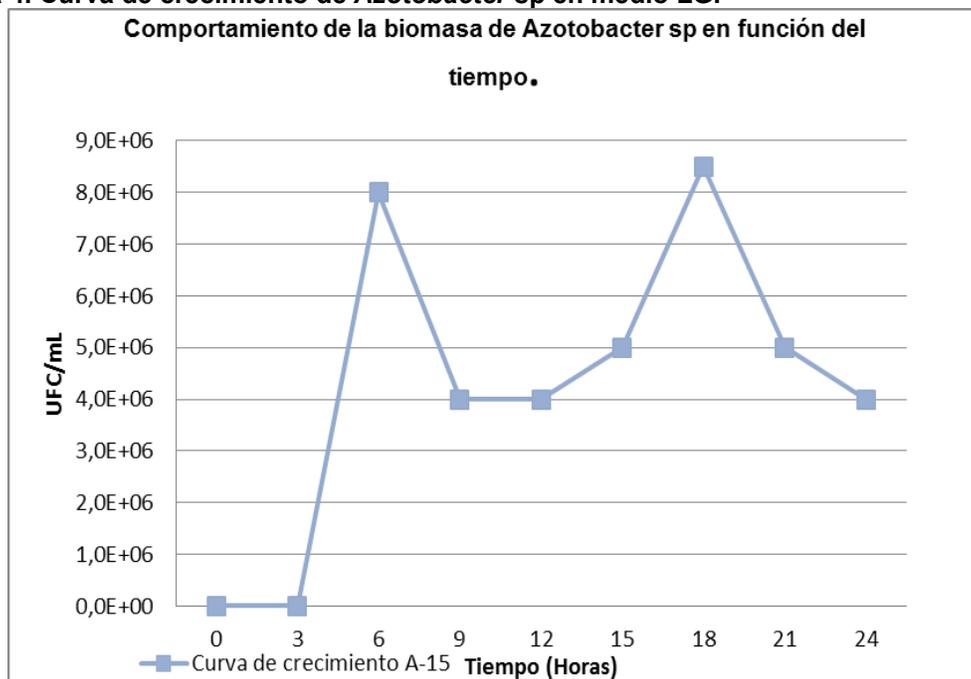
Fuente: Autores.

Desde el inicio del inoculo, hora cero a la hora tres se evidencia la fase de latencia y/o adaptación, momento en el que se presenta una escasa o nula división celular, sin embargo la población microbiana atraviesa una etapa de intensa actividad metabólica. Posteriormente inicia la fase exponencial que comienza desde la hora tres hasta la hora 12, en este espacio de tiempo las bacterias comienzan a dividirse y la reproducción celular alcanza una actividad máxima. A continuación,

se observa la fase estacionaria desde la hora 12 hasta la hora 18 en este momento la tasa de crecimiento disminuye, pues se estabiliza la población al compensar el número de muertes microbianas con el número de células nuevas, finalmente se llega a la fase de declinación en donde el número de muertes supera el número de nuevas células formadoras. Estos resultados concuerdan con lo descrito por Tortora, Funke & Case (2007), frente al comportamiento del crecimiento bacteriano.

Finalmente el comportamiento obtenido por la curva de crecimiento de la gráfica 3 en las fases de latencia, exponencial y estacionaria, son similares en los tiempos reportado en los trabajos de autores como Bobadilla & Rincón (2008), Becerra et al., (2011) para bacterias solubilizadoras de fosfatos, en medios de cultivo SRSM.

Gráfica 4. Curva de crecimiento de *Azotobacter* sp en medio LGI



Fuente: Autores.

La gráfica anterior describe el comportamiento de *Azotobacter* sp inoculada en medio LGI, donde se presenta la fase de latencia desde la hora 0 hasta la hora 3, considerándose este periodo como el proceso de ajuste que las células experimentan cuando son transferidas de un medio a otro, por lo que su adaptación depende de dos factores principales: la composición del medio y el estado fenológico de la cepa (Dos Santos, 2007).

Desde la hora 3 hasta la hora 6, se presenta la fase exponencial que se traduce en un alto consumo de nutrientes por lo que las células se multiplican a un ritmo constante. Posteriormente de la hora 6 a la hora 9 la población declina ligeramente y se presenta la fase estacionaria desde la hora 9 hasta la hora 12, caracterizándose por no observarse incremento en el número de bacterias, según Scragg (2000) en la fase estacionaria el metabolismo bacteriano varía debido a la

liberación de metabolitos o desechos, consecuencia de la escases de nutrientes esenciales y variaciones ambientales en el medio, situación que desencadena condiciones adversas para el inoculo (Augustin,2000), por otra parte, la transición que ocurre entre la fase exponencial a la fase estacionaria presenta un comportamiento fluctuante debido a que los compuestos celulares son sintetizados a velocidades diferentes.

A partir de la hora 12 hasta la hora 18 la población aumenta gradualmente y se presenta el segundo punto máximo de división celular que depende del potencial genético de la cepa, el tipo de medio y las condiciones en las cuales se desarrolla (Dos Santos, 2007).

Por último, la fase de muerte comprende desde la hora 18 hasta la hora 24, como consecuencia del agotamiento de nutrientes, presentándose una disminución lineal en cuanto al número de células viables a lo largo del tiempo (Prescott, Harley & Klein, 1999).

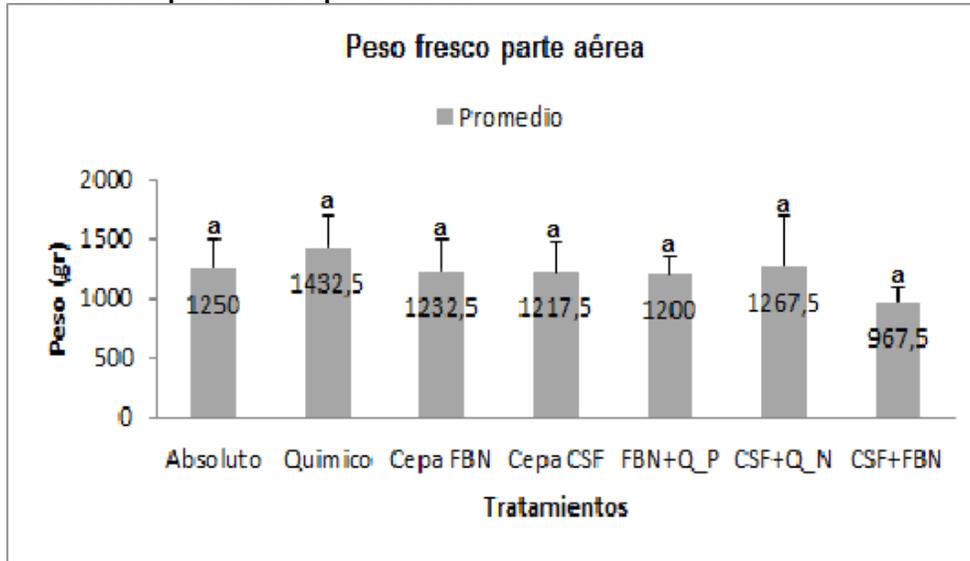
7.3 EVALUACIÓN EN CAMPO

Transcurridos 90 días después del establecimiento de la pradera compuesta por pasto Kikuyo (*Pennisetum clandestinum*) y Ryegrass (*Lolium* sp.), se tomaron muestras correspondientes al 10% del área total de cada tratamiento establecido en campo, para así obtener el peso fresco (PF), peso seco (PS) y porcentaje de materia seca (MS%) tanto de la parte aérea como radicular de las muestras sometidas a las diferentes inoculaciones aplicadas.

7.3.1 Análisis estadístico. Los datos obtenidos y analizados en el programa SPSS, indicaron la distribución normal de los datos a través de la prueba de Shapiro- Wilk para cada una de las variables evaluadas, por otra parte la prueba de Levenne corroboró la homogeneidad de varianzas de cada uno de los tratamientos. Finalmente para el análisis de varianza se empleo la prueba de ANDEVA de un factor (véase Anexo H).

A continuación, se muestran las gráficas que indican los promedios obtenidos para: peso fresco (PF), peso seco (PS) y porcentaje de materia seca (MS%), correspondientes a cada uno de los tratamientos evaluados en campo de la parte aérea y radicular de los pastos de la pradera compuesta.

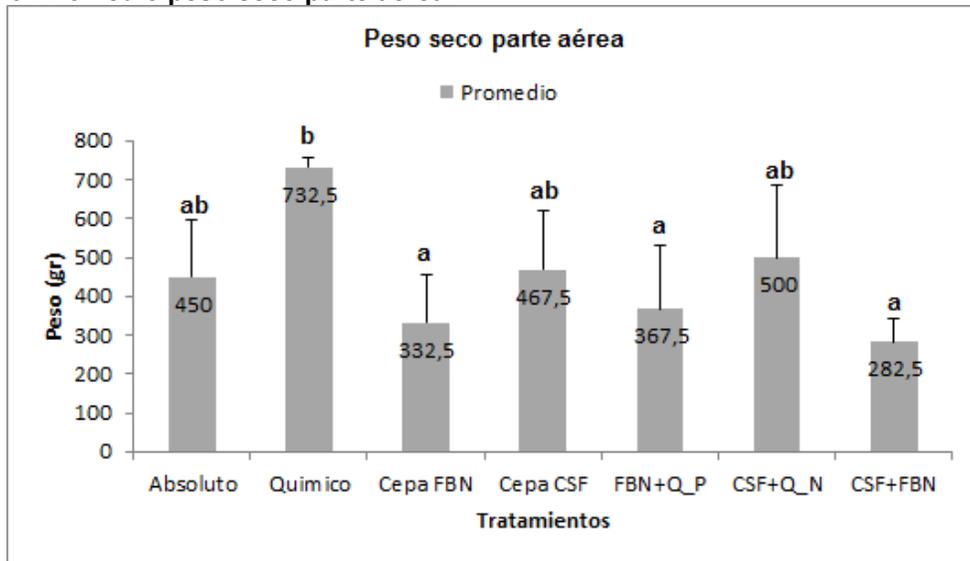
Gráfica 5. Promedio peso fresco parte aérea.



*Cada valor representa el promedio de cuatro repeticiones. Letras iguales indican que no hay diferencias significativas entre los tratamientos según ANDEVA de un factor ($\alpha=0.05$)
Fuente: Autores.

El análisis de varianza de un factor para los datos obtenidos del PF de la parte aérea de cada uno de los tratamientos aplicados, indica que no existen diferencias significativas entre los PF evaluados para la parte aérea de cada uno de los tratamientos ($p>0.05$).

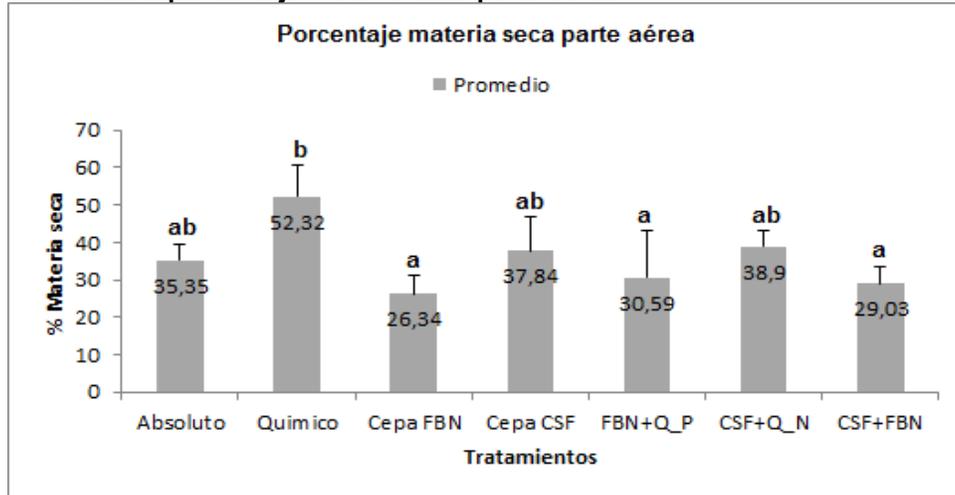
Gráfica 6. Promedio peso seco parte aérea.



*Cada valor representa el promedio de cuatro repeticiones. Letras diferentes indican diferencias significativas entre los tratamientos según ANDEVA de un factor ($\alpha=0.05$)
Fuente: Autores.

El análisis de varianza evidencia que los datos obtenidos para el PS de la parte aérea de los tratamientos aplicados en campo, tienen diferencias significativas ($p < 0,05$). De acuerdo a lo anterior, la prueba de Tukey muestra que las principales diferencias dividen a los tratamientos en dos grupos en donde el tratamiento químico presentó el valor más alto.

Gráfica 7. Promedio porcentaje materia seca parte aérea.

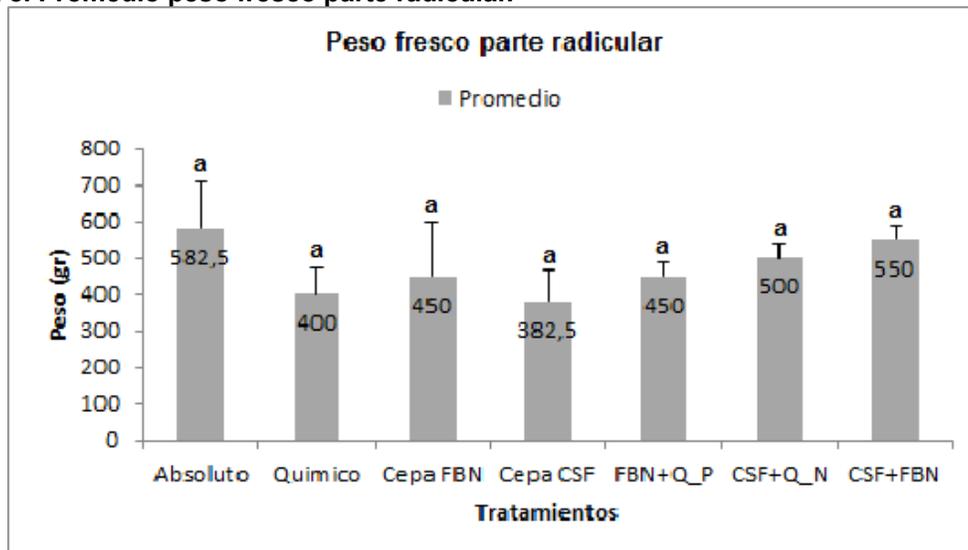


*Cada valor representa el promedio de cuatro repeticiones. Letras diferentes indican diferencias significativas entre los tratamientos según ANDEVA de un factor ($\alpha = 0,05$)

Fuente: Autores

El análisis de varianza para los datos del %MS de la parte aérea, evidencia que existen diferencias significativas entre los tratamientos ($p < 0,05$). La prueba de Tukey muestra que las principales diferencias dividen a los tratamientos en dos grupos en donde el tratamiento químico presentó el valor más alto.

Gráfica 8. Promedio peso fresco parte radicular.

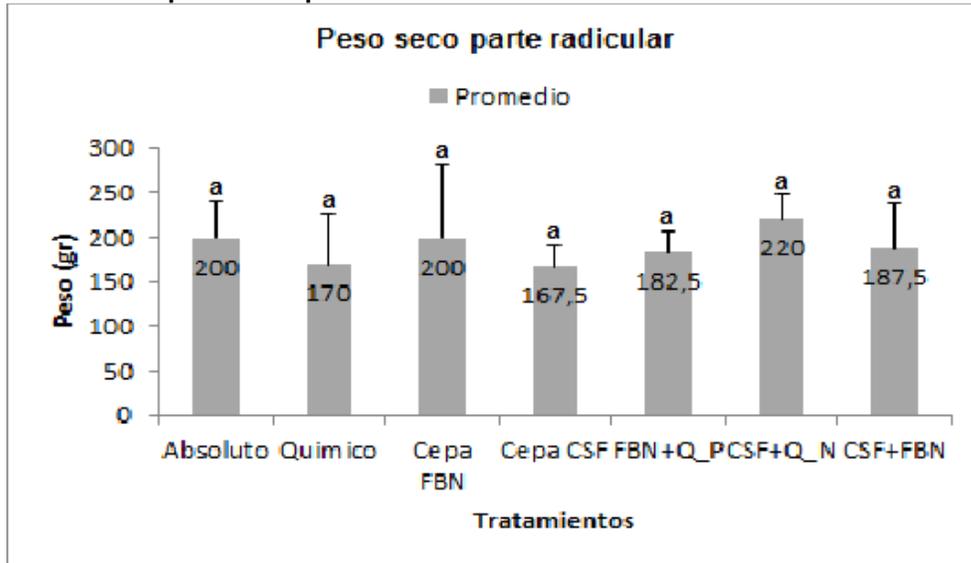


*Cada valor representa el promedio de cuatro repeticiones. Letras iguales indican que no hay diferencias significativas entre los tratamientos según ANDEVA de un factor ($\alpha=0.05$)

Fuente: Autores

El análisis de varianza para los datos obtenidos en cuando al PF de la parte radicular, evidencia que no existen diferencias significativas entre los tratamientos ($p>0.05$).

Gráfica 9. Promedio peso seco parte radicular.

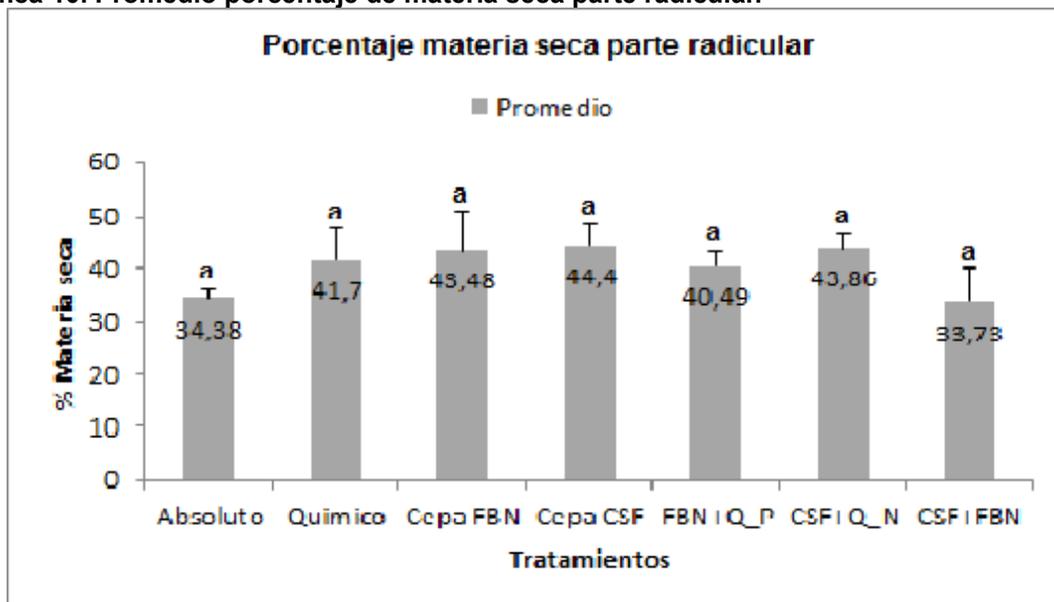


*Cada valor representa el promedio de cuatro repeticiones. Letras iguales indican que no hay diferencias significativas entre los tratamientos según ANDEVA de un factor ($\alpha=0.05$)

Fuente: Autores

El análisis de varianza para el PS de la parte radicular, evidencia que no existen diferencias significativas ($p>0.05$) entre los tratamientos.

Gráfica 10. Promedio porcentaje de materia seca parte radicular.



*Cada valor representa el promedio de cuatro repeticiones. Letras iguales indican que no hay diferencias significativas entre los tratamientos según ANDEVA de un factor ($\alpha=0.05$)

Fuente: Autores.

El análisis de varianza para los datos obtenidos para el %MS, evidencia que no existen diferencias significativas entre los tratamientos aplicados en campo ($p>0.05$).

En la evaluación de las variables establecidas, se evidencia que las inoculaciones en campo no presentan diferencias significativas en el peso fresco de la parte aérea de los pastos de la pradera compuesta. Por el contrario, en las variables de peso seco y porcentaje de materia seca de la parte aérea indican que existieron diferencias significativas en donde el tratamiento químico presentó el mejor comportamiento en comparación a los demás tratamientos. Por su parte la evaluación de las variables: peso fresco, peso seco y porcentaje de materia seca en las raíces de los pastos de la pradera compuesta, indicaron que no existieron diferencias entre los tratamientos.

Dentro de los efectos benéficos que brindan las BPCV se han reportado: incrementos en la tasa de germinación, peso altura, desarrollo radical, productividad, área foliar, contenido de clorofila, magnesio, nitrógeno, proteína, actividad hidráulica, tolerancia a la sequía y retraso en la senescencia foliar, la magnitud de estos incrementos son variables oscilando desde un mínimo porcentaje hasta más del 400% en algunos casos, el origen de estas diferencias no se entiende completamente aún; sin embargo se sabe que el resultado depende de la planta, la cepa utilizada y las condiciones ambientales en la que se encuentran las plantas inoculadas Lucy et al (Citado en Hoyos, 2011).

Para el caso de BPCV en pasturas Bonilla et al., (2010) menciona que la inoculación de estas bacterias favorece el crecimiento y nutrición vegetal, por su parte Ezqueda et al., (2002) en su estudio sugiere que el efecto positivo por parte de las BPCV se puede atribuir a que las bacterias propician el desarrollo vegetal al permitir el incremento en la proliferación de vellosidades de la raíz con lo que incrementa la absorción de agua y nutrientes, así mismo en el estudio realizado por Criollo et al. (2012), *Pseudomonas* sp y *Stenotrophomonas* sp tuvieron la capacidad de promover el crecimiento vegetal en *Pennisetum clandestinum*, incrementando el peso seco y fresco de a planta en relación con el control químico, bajo condiciones de invernadero.

En el presente estudio fueron utilizadas las cepas *Azotobacter* sp y *Pseudomonas* sp, bacterias reconocidas por su capacidad en la promoción del crecimiento vegetal, sin embargo Ramirez & Klopper (2011) afirman que dentro de una misma especie bacteriana se encuentran algunas cepas capaces de promover el crecimiento vegetal, mientras que otras no; incluso algunas pueden ocasionar

efectos negativos en el desarrollo de las plantas, por lo cual el mismo autor resalta que la capacidad para promover el crecimiento vegetal es algo que debe ser evaluado para cada aislamiento bacteriano y que no puede ser concluido basado en su clasificación taxonómica, como lo observado en los resultados obtenidos, en donde se evidencia que la inculaciones no superaron al tratamiento convencional.

CONCLUSIONES

Las bacterias inoculadas en la pradera compuesta con pastos Kikuyo y Rye grass, correspondientes a los géneros *Azotobacter* sp y *Pseudomonas* sp reportadas por algunos autores como promotoras de crecimiento vegetal en gramíneas, deben considerar otros factores dentro del proceso de aplicación en campo que insinúen la adaptación de las mismas con las plantas y su comportamiento frente a las diferentes condiciones edafoclimáticas que presente la zona de estudio a fin de obtener resultados quizá más prometedores.

Las cepas identificadas en el presente estudio, pertenecen a géneros que comúnmente han sido caracterizados en éste tipo de investigaciones, sin embargo, es probable que en el ejercicio de aislamiento se hayan descartado otros géneros con un mayor potencial de promoción de crecimiento vegetal para la finca Caseteja San Luis.

La determinación del ácido indol acético como sustancia endógena bioactiva, no es un indicador directo de la fijación de nitrógeno, sin embargo al controlar diversos procesos del desarrollo vegetal, su presencia puede inducir la división celular, la formación de raíces y por tanto la captación adecuada de nutrientes esenciales como el nitrógeno, que para este estudio es de gran relevancia, por el aporte al desarrollo foliar de los pastos.

La síntesis microbiológica de fitohormonas tales como el ácido indol acético puede constituir una alternativa viable en el contexto de una agricultura ecológica sostenible, ya que la aplicación de inóculos microbiales que tengan ésta capacidad, reduce el impacto ambiental.

BIBLIOGRAFÍA

- Abril, A. (2003). ¿Son los microorganismos edáficos indicadores de impacto productivo en los ecosistemas? *Ecología Austral*, 13 (2), 195-204.
- Augustin, J.C., Brouillaud-Delattre, A., Rosso, L., & Carlier, V. (2000). Significance of inoculum size in the lag time of *Listeria monocytogenes*. *Applied and Environmental Microbiology*, 66(1), 1706-1710.
- Ahmad, F., Ahmad, I., & Khan, M.S (2008). Screening of free-living rhizospheric bacteria for their multiple plant growth promoting activities. *Microbiological Research*, 163(2), 173- 181.
- Altieri, M.A., & Nicholls, C.I. (2004). *Biodiversity and pest management in agroecosystems*. New York: Food Products Press.
- Anandham, A., Choi, K. H., Gandhi, P.I., Yim, W.J., Park, J.P., Kim, K.A., Madhaiyan, A. & Min Sa, T. (2007). Evaluation of shelf life and rock phosphate solubilization of *Burkholderia* sp In nutrient – amended clay, rice bran and rock phosphate – based granular formulation. *World Journal Microbiology Biotechnology*, 23(8), 1121-1129.
- Anaya, A.L. (2003). *Ecología química*. México D.F: Plaza y Valdés.
- Antoun, H., Prevost, D. (2005). Ecology of plant growth promoting rhizobacteria. En Z.A. Siddiqui (Ed.), *PGPR: Biocontrol and Biofertilization*. (pp. 1-38). Dordrecht, Holanda: Springer.
- Arshad, M., & Frankenberger, W. (1997). Plant growth-regulating substances in the rhizosphere: Microbial production and functions. *Advances in agronomy*, 62, 45-151.
- Aycaya, G.(2012). *Influencia de la biofertilización con Azotobacter chroococcum en la producción y calidad de cebolla rosada (Allium cepa L) en el valle de Locumba (Trabajo de pregrado)*. Universidad Nacional Jorge Basadre Grohmann-Tacna. Tacna, Perú.
- Ashrafuzzaman, M., Hossen, S.A., Ismail, M.R., Hoque, M.A., Islam M.Z., Shahidulla, S.M. & Meon, S. (2009). Efficiency of plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR) for enhancement of rice growth. *African Journal of Biotechnology*, 8(7), 1247-1252.

- Bagwell, C.E., Piceno, Y.M, Ashboune & Lovell, C.R. (1998). Physiological diversity of the rhizosphere diazotroph assemblage of selected salt Marsh grasses. *Applied and Environmental Microbiology*, 64(11), 4276-4282.
- Barea, J., Azcón, R., & Azcón-Aguilar, C. (2005). Interaction between mycorrhizal fungi and bacteria to improve plant nutrient cycling and soil structure. En F. Buscot, & A. Varma. (Eds.), *Microorganisms in soils: Roles in genesis and functions* (pp. 195-212). Berlin: Springer- Verlag.
- Barg, R. & Armand, F.Q. (2007). *Agricultura agroecológica – orgánica en el Uruguay. Principales conceptos, situación actual y desafíos*. Uruguay: RAP –AL Uruguay.
- Bashan, Y., Holguín, R., & Ferrera-Cerrato., R. (1996). Interacciones entre plantas y microorganismos benéficos. *Terra Latinoamericana*, 14(2), 195-210.
- Bashan, Y. (1998). Inoculants of plants growth-promoting bacteria for use in agriculture. *Biotechnology Advances*. 16 (4). 729-770.
- Bazinger, M., Edmeades, G.O., & Bolaños, J. (1997). Relación entre el peso fresco y el peso seco del rastrojo de maíz en diferentes estados fenológicos del cultivo. *Agronomía Mesoamericana*, 8(1), 20-25.
- Beauchamp, C.J., Dion, P., Kloepper, J.W., & Antoun, H. (1991). Physiological characterization of opine-utilizing rhizobacteria for traits related to plant growth-promoting activity. *Plant and Soil*, 132(2), 273-279.
- Becerra, J.M., Quintero, D., Martínez, M., & Matiz, A. (2011). Caracterización de microorganismos solubilizadores de fosfatos aislados de suelos destinados al cultivo de Uchuva (*Physalis peruviana L.*). *Revista Colombiana de Ciencias Hortícolas*, 5(2), 195-208.
- Beltran, S., Torrado, Y., Martínez, M. & Matiz, A. (2005). *Aislamiento de bacterias con actividad fosfato solubilizadora a partir de suelos ácidos del norte de Boyacá y producción de un inóculo mixto en fermentación discontinua* (Tesis de pregrado). Pontificia Universidad Javeriana, Bogotá, Colombia.
- Benítez, A. (2005). *Avance en biotecnología vegetal e ingeniería genética en las plantas*. Barcelona: Editorial Reverté S.A.
- Bernal, J., & Espinosa, J. (2003). *Manual de Nutrición y Fertilización de Pastos*. Quito, Ecuador: IPNI.
- Bilal, R., Rasul, G., Arshad, M., & Malik, K. (1993). Attachment, colonization and proliferation of *Azospirillum brasilense* and *Enterobacter spp.* on root surface of grasses. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 9(1), 63-69.

- Bobadilla, C. & Rincón, S.C. (2008). *Aislamiento y producción de bacterias fosfato solubilizadoras a partir de compost obtenido de residuos de plaza* (Tesis de pregrado). Pontificia Universidad Javeriana, Bogotá, Colombia.
- Borda, D., Pardo, J.M., Martínez, M.M., & Montaña, J.S. (2009). Producción de un biofertilizante a partir de un aislamiento *Azotobacter nigricans* obtenido en un cultivo de *Stevia rebaudiana* Bert. *Universitas Scientiarum*, 14(1), 71-78.
- Borda, D., Pardo, J., Montaña, J., & Martínez, M. (2011). Influencia de la materia orgánica y *Azotobacter nigricans* en un cultivo de *Stevia rebaudiana* B. *Universitas Scientiarum*, 16(3), 282-293.
- Bowen, G.D., & Rovira, A.D. (1999). The rhizosphere and its management to improve plant growth. *Advances in Agronomy*, 66, 1-102.
- Brady, N., & Weil, R. (1999). *The nature and properties of soils*. New Jersey: Prentice Hall.
- Burbano, H. (2006). La acción de los microorganismos del suelo a favor de las plantas: Conceptos básicos y posibilidades. En L.A. Castilla. (Ed.), *Biofertilización: Alternativa Viable para la Nutrición Vegetal* (pp. 17-36). Ibagué: L&L Impresiones.
- Caballero, J. (2006). Microbiología Agrícola e interacciones microbianas con plantas. *Revista Latinoamericana de microbiología*, 48(2), 154-161.
- Cárdenas, D., Garrido, M., Bonilla, R., Baldani, V. (2010). Aislamiento e identificación de cepas de *Azospirillum* sp en pasto guinea (*Panicum máximum* Jacq.) del Valle del Cesar. *Pastos y Forrajes*, 33(3), 130-144.
- Carulla, J., Cárdenas, E., & Riveros, C. (2004). Valor nutricional de los forrajes más usados en los sistemas de producción lechera especializada de la zona andina colombiana. En Eventos y Asesorías Agropecuarias EU (ed.), *Seminario Nacional de Lechería Especializada "Bases Nutricionales y su Impacto en la Productividad"*, (pp. 21-38). Medellín.
- Castilla, L.A. (2006). La Biofertilización en el Manejo Integrado de Nutrimientos para la Nutrición Vegetal. En L.A. Castilla. (Ed.), *Biofertilización: Alternativa Viable para la Nutrición Vegetal* (pp. 7-16). Ibagué: L&L Impresiones.

- Chang, C.H., & Yang, S.S. (2009). Thermo – tolerant phosphate – solubilizing microbes for multi-functional biofertilizer preparation. *Bioresource Technology*, 100(4), 1648-1658.
- Chen, Y.P., Rekha., P.D., Arun, A.B., Shen, F.T., Lai, W.A. & Young, C.C. (2006). Phosphate solubilizing bacteria from subtropical soil and their tricalcium phosphate solubilizing abilities. *Applied Soil Ecology*, 34(1), 33-41.
- Clavijo, P. (1998). *Tecnología Agrícola Básica*. Bogotá: Tercer Mundo Editores.
- Cortés, A.X. (2011). *Selección de cepas nativas de bacterias Diazotróficas simbióticas asociadas a la leguminosa Clitoria ternatea en el César y la Guajira* (Tesis de maestría). Universidad Militar Nueva Granada. Bogotá, Colombia.
- Criollo, P.J., Obando, M., Sanchez, L. & Bonilla, R. (2012). Efecto de bacterias promotoras de crecimiento vegetal (PGPR) asociadas a Pennisetum clandestinum en el altiplano Cundiboyacense. *Revista Corpoica, Ciencia y Tecnología Agropecuaria*, 13(2), 189-195.
- Curl, E.A., & Truelove, B. (1986). *The Rhizosphere*. Berlin, Alemania: Springer-Verlaq.
- De-Bashan, L., Holguin, G., Glick, B., & Bashan, Y. (2007). Bacterias promotoras de crecimiento en plantas para propósitos agrícolas y ambientales. En R. Ferrera, & A. Alarcón. (Ed.), *Microbiología Agrícola Hongos, Bacterias, micro y macrofauna, control biológico y planta-microorganismos* (pp. 161-215). México D.F: Trillas.
- Del Campillo, S. D., Zee, S. V., & Torrent, J. (1999). Modelling long term phosphorus leaching and changes in phosphorus fertility in excessively fertilized acid sandy soils. *European Journal of Soil Science*, 50(3), 391-399.
- Dibut, B., & Martínez, R. (2006). *Obtención y manejo de biofertilizantes como insumos indispensables de la agricultura sostenible*. Memoria Agricultura Orgánica. La Habana: Fundacion Produce Sinaloa AC.
- Dos Santos, J (2007). Estudio del comportamiento cinético de microorganismos de interés en seguridad alimentaria con modelos matemáticos. Barcelona: Universidad Autónoma de Barcelona.
- Doyle, M., Beuchat, L. & Monteville, T. (2001). *Microbiología de los alimentos fundamentos y frontera*. España: Acribia

- Echegaray-Alemán, A. (1995). El ciclo del nitrógeno y fases que lo constituyen. En R. Ferrera - Cerrato, & J. Pérez (Eds.), *Agromicrobiología, elemento útil en la agricultura sustentable*. (pp. 7-35). Montecillo, México: Colegio de postgraduados en ciencias agrícolas.
- Elmerich, C., Zimmer, W., & Vieille, C. (1992). Biological nitrogen fixation. En Stacey, G., Burris, R.H., & Evans, H.J (Eds.), *Associative nitrogen fixing bacteria* (pp 212-258). New York: Chapman and Hall.
- Escobar, C., Horna, Y., Carreño, C., & Mendoza, G. (2001). Caracterización de cepas nativas de *Azotobacter* spp y su efecto en el desarrollo de *Lycopersicon esculentum* Mill "tomate" en Lambayeque. *Scientia Agropecuaria*, 2(1),39-49.
- Estrada, J. (2002). *Pastos y Forrajes para el Trópico Colombiano*. Manizales, Colombia: Universidad de Caldas.
- Federación Colombiana de Ganaderos. (2006). *Plan Estratégico de la Ganadería Colombiana 2019*. Bogotá: Sanmartín Obregón EJ Cía.
- Ferrera, R., & Alarcón, A. (2007). *Microbiología agrícola: Hongos, bacterias, micro y macrofauna, control biológico y planta- microorganismo*. México, D.F.: Trillas.
- Gaitán, I., & García, E. (1998). *Prueba a nivel de campo y escalado a planta piloto el proceso de producción de biofertilizante*. Universidad Nacional de Ingeniería. Managua, Nicaragua.
- García de Salamone, I.E., Escobar, J.S., Gatica, M., Di Salvo, L.P., Vilches, M.V., Zubillaga, M.M., & Urquiaga, S. (2009). *Effect of Azospirillum inoculation on N-cycling microorganisms associated with rice and wheat crops*. En 16th Nitrogen Workshop, Connecting Different Scales of Nitrogen Use in Agriculture. Turin, Italy.
- García, F., Rosello, J. & Santamarina, M.P. (2006). *Introducción al funcionamiento de las plantas*. Valencia: Universidad Politécnica de Valencia.
- Gardeva, P., Van Veen, J.A., & Van Elsas, J.D.(2004). Microbial diversity in soil: Selection of microbial populations by plant and soil type and implications for disease suppressiveness. *Annual Review of Phytopathology*, 42 (3),243-270.
- Gardner, A.L (1967). *Estudio sobre los métodos agronómicos para la evaluación de las pasturas*. Montevideo: IICA-zona sur

- Garrido, M.F. (2007). *Aislamiento e Identificación de Bacterias Diazotróficas Rizosféricas y Endófitas Asociadas a Suelos y Pastos del Valle y Sabana del Cesar en Dos Épocas Climáticas* (Tesis de Maestría). Universidad Militar Nueva Granada. Bogotá, Colombia.
- Gaur, A.C. (1990). *Phosphate solubilizing microorganisms as biofertilizer*. New Delhi – India: Omega Scientific Publication.
- Gianella, T., Pinzás, T., & Ugás, R. (2010). Producción de Ganado en la Agricultura Campesina, *LEISA*, 26(1), 4.
- Glick, B.R., Patten, C.L., Holguin, G., & Penrose, D.M., (1999). *Biochemical and Genetic Mechanisms Used by Plant Growth Promoting Bacteria*. London: Imperial College Press.
- Gómez, C.E. (2002). *Modelo para la Evaluación, Monitoreo y Seguimiento del Impacto Ambiental de las Actividades Agrícolas Intensivas sobre los Suelos Colombianos* (Tesis de Maestría). Universidad Nacional. Bogotá, Colombia.
- Gulati, A., Rahi, P. & Vyas, P. (2008). Characterization of Phosphate Solubilizing Fluorescent Pseudomonads from the rhizosphere of Seabuckthorn Growing in the cold deserts of Himalayas. *Current Microbiology*, 56(1) 73-79.
- Gyaneshwar, P., Parekh, L.J., Shrestha, G., Poole, P.S., Collins, M.D., Hutson, R.A., & Kumar. (1999). Involvement of a phosphate starvation inducible glucose dehydrogenase in soil phosphate solubilization by *Enterobacter asburiae*. *FEMS Microbiology Letters*, 171(2), 223-229.
- Gyaneshwar, P., Naresh, G., Parekh, L., & Poole, P. (2002). Role of soil microorganisms in improving P nutrition of plants. *Plant and Soil*, 245(1), 83-93.
- Hannaway, D., Fransen, S., Cropper, J., Teel, M., Chaney, M., Girggs, T., et.al. (1999). *Perennial Ryegrass (Lolium perrene L.)*. Oregon: Oregon State University.
- Hassan, G., Zargar, M.Y., & Beigh, G.M. (1997). Biocontrol of Fusarium Root Rot in the Common Bean (*Phaseolus Vulgaris L.*) by using Symbiotic *Glomus mosseae* and rhizobium leguminosarum. *Microbial Ecology*, 34(1), 74-80.
- Hernández, M., Pereira, M., & Tang, M. (1994). Utilización de los microorganismos biofertilizantes en cultivos tropicales. *Pastos y forrajes*, 17(3), 183-142.
- ICA. (1992). *Fertilizantes en diversos cultivos*. Bogotá: Produmedios.

- Izaguirre, M.L., Labandera, C., & Sanjuan, J. (Eds.). (2007). *Biofertilizantes en Iberoamérica: Una visión técnica, científica y empresarial*. Montevideo, Uruguay: Imprenta Denad internacional S.A Duvimioso.
- Jiménez, D.J. (2007). *Caracterización molecular de cepas nativas colombianas de Azotobacter spp mediante el análisis de restricción del DNA ribosomal 16s* (Tesis de pregrado). Pontificia Universidad Javeriana. Bogotá, Colombia.
- Kennedy, A.C., & Smith, K.L. (1995). Soil microbial diversity and sustentability of agricultural soils. *Plant and Soil*, 170(1), 75-86.
- Kennedy, I.R., Rudnick, P., MacDonald, M., & Melton, T. (2005). Genus III: *Azotobacter*. En G.M. Garrity (Ed.). *Bergey's manual of systematic bacteriology*. (pp.384-402). New York: Springer.
- Kuss, A.V. (2006). *Fixação de nitrogênio por bactérias diazotróficas em cultivares de arroz irrigado* (Tesis de doctorado). Universidad Federal de Santa María. Rio Grande do su, Brasil.
- Lafaurie, J.L. (2008). Ganadería del futuro: Responsabilidad social y ambiental. En E. Murgueitio., C.A. Cuartas, & J.F. Naranjo. (Eds.), *Ganadería del futuro: Investigación para el desarrollo* (pp. 13-18). Cali: Feriva S.A.
- Lallana, V. & Lallana, M. (2001). *Manual de prácticas de fisiología vegetal*. Parana, Argentina: Facultad de Ciencias Agropecuarias UNER
- Lara, C., Esquivel, L.M., & Negrete, J.L. (2011). Bacterias nativas solubilizadores de fosfatos para incrementar los cultivos en el departamento de Córdoba- Colombia. *Biotecnología en el Sector Agropecuario y Agroindustrial*, 9(2), 114-120.
- Lara, C., Oviedo, L., & Betancur C. (2011). Bacterias nativas con potencial en la producción de ácido indol-acético para mejorar los pastos. *Zootecnia Tropical*, 29(2), 187-194.
- Laurin, M., Llosa, M.J., González., & Porcuna, J.L. (2006). El papel de la agricultura ecológica en la disminución del uso de fertilizantes y productos fitosanitarios químicos. Recuperado el 30 de Agosto de 2012, del sitio web SEAE: <http://www.agroecologia.net/recursos/publicaciones/publicaciones-online/2006/CD%20Congreso%20Zaragoza/Ponencias/105%20Laurin%20Com-%20EI%20papel.pdf>.

- Lemanceau, P., & Alabouvette, C. (1993). Suppression of Fusarium wilts by fluorescent pseudomonads: mechanisms and applications. *Biocontrol science and Technology*, 3(3), 219-234.
- Loredo, C., López, L., & Espinosa, V. (2004). Bacterias promotoras del crecimiento vegetal asociadas con gramíneas. *Terra Latinoamericana*, 22(2), 225-239.
- Lozano, M.D., Corredor, G.A., Vanegas, M.A., Figueroa., & Ramírez, F. (2006). *Sistemas silvopastoriles con uso de biofertilizante: opción tecnológica para el Valle Cálido del Alto Magdalena*. Espinal, Colombia: Produmedios.
- Lugtenberg, B., & Kamilova, F. (2009). Plant-Growth-Promoting Rhizobacteria. *Annual Review of Microbiology*, 63(10), 541-556.
- Mahecha, L., Gallego, L., & Peláez, F. (2002). Situación actual de la ganadería de carne en Colombia y alternativas para impulsar su competitividad y sostenibilidad. *Col ciencias pecuarias*, 15(2), 213 - 225.
- Mandinba, G., Heulin, T., Bally, R., Guckert, A., & Balandreau, J. (1986). Chemotaxis of free-living nitrogen-fixing bacteria towards maize mucilage. *Plant and Soil*, 90(3), 129-139.
- Mantilla, C.L. & Zumaque L.E. (2008). *Bacterias Diazotróficas con Potencial Biofertilizante para una Agricultura Limpia y Productiva*. Montería, Córdoba: (Sic) Editorial Ltda.
- Marais, J. (2001). Factors affecting the nutritive value of kikuyu grass (*Pennisetum clandestinum*) - a review. *Tropical Grasslands*, 35(2), 65-84.
- Martínez, P. & Garcia, D.G. (2010). Bacterias diazotróficas y solubilizadoras de fósforo aisladas de las especies forestales Altoandinas colombianas *Weinmannia tomentosa* y *Escallonia myrtillades*. *Revista Intropica*, 5(5), 63-76.
- Mila, A., & Corredor, G. (2004). Evolución de la composición botánica de una pradera de kikuyo (*Pennisetum clandestinum*) recuperada mediante escarificación mecánica y fertilización con compost. *Revista Corpoica*, 5(1), 70-75.
- Millar, C. (1964). Fertilidad del suelo. Barcelona: Salvat.
- Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural; Departamento Administrativo Nacional de Estadística; Corporación Colombiana Internacional. (2010). *Encuesta Nacional Agropecuaria 2010*. Recuperado el 02 de

septiembre de 2012, del sitio web:
<http://www.cci.org.co/oferta/EncuestaNacional2010B.pdf>.

- Murgueitio, E. (1999). *Reconversión ambiental y social de la ganadería en Colombia*. Recuperado el 29 de Agosto de 2012, del sitio web:
<http://www.fao.org/docrep/x3770t/x3770t02.htm#TopOfPage>.
- Murgueitio, E., & Ibrahim, M. (2008). Ganadería y Medio Ambiente en América Latina. En E. Murgueitio, C.A. Cuartas, & J.F. Naranjo (Eds.), *Ganadería para el Futuro: Investigación y Desarrollo para el Desarrollo* (pp. 19-40). Cali: Fundación CIPAV.
- Murphy, J. & Riley, J.P. (1962). A modified single solution method for the determination of phosphate in natural waters. *Analytica Chimica Acta*, 27, 31-36.
- Naiman, A., Latrónico, A., & Garcia, I. (2009). Inoculation of wheat with *Azospirillum brasilense* and *Pseudomonas fluorescens*: Impact on the production and culturable rhizosphere microflora. *European Journal of Soil Biology*, 45(1), 44-51.
- Navarro, G. (2003). *Química agrícola*. Madrid, España: Mundi- Prensa.
- Ochoa, M.S., Madrigal, R., Martínez, M. & Carreón, Y. (2010). Plantas, hongos micorrízicos y bacterias: su compleja red de interacciones. *Revista de la DES Ciencias Biológico Agropecuarias*, 12(1), 65-71.
- Omar, S.A. (1998). The role of rock-phosphate-solubilizing fungi and vesicular arbuscular mycorrhiza (VAM) in growth of wheat plants fertilized with rock phosphate. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, 14(2), 211-218.
- Osorio, N.W. (2007). Efectos benéficos de bacterias rizosféricas en la disponibilidad de nutrientes en el suelo y la absorción de nutrientes por las plantas. *Revista Facultad Nacional de Agronomía*, 60(1), 3621-3643.
- Organización de las Naciones unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO). (2009). *El estado mundial de la agricultura y la alimentación*. Roma: FAO.
- Otálora, J., Patiño, M., Martínez, M., & Pedroza, A. (2003). *Estandarización de prueba para la detección de fosfatasa producida por bacterias solubilizadoras de fosfatos* (Tesis de pregrado). Pontificia Universidad Javeriana, Bogotá, Colombia.

- Pan B., Bai, Y., Leibovitch, S. & Smith, D. (1999). Plant-growth promoting rhizobacteria and Kinetin as ways to promote corn growth and yield in a short-growing-season area. *European Journal of Agronomy*, 11(3), 179-186.
- Paredes, M. & Espinosa, D. (2010). Ácidos orgánicos producidos por rizobacterias que solubilizan fosfato: Una revisión Crítica. *Terra Latinoamericana*, 28(1), 61-70.
- Patten, C.H., & Glick, B.R. (1996). Bacterial biosynthesis of inole-3-acetic acid (Review). *Canadian Journal of Microbiology*, 42(3), 207-227.
- Pedraza, R.O., Teixeira, K.R., Fernández, A., Garcia de Salomone, I., Baca, E.B., Azcón, R., Baldani, L.D., & Bonilla, R. (2010). Microorganismos que mejoran el crecimiento de las plantas y la calidad de los suelos. *Revista Corpoica- Ciencia y Tecnología Agropecuaria*, 11(2), 155-164.
- Pérez, C. (1997). *Producción de biofertilizante a partir de Azotobacter chroococcum*. Universidad Nacional de Ingeniería. Managua, Nicaragua.
- Perrine, F., Rolfe, B., Hynes, M., & Hocart, C. (2004). Gas chromatography-mass spectrometry analysis of indolacetic acid and tryptophan following aqueous chloroformate derivation of Rhizobium exudates. *Plant Physiology and Biochemistry*, 42(9), 723-729.
- Prescott, L.M., Harley, J.P & Klein, D.A (1999). *Microbiología*. Madrid: Mc Graw-Hill interamericana.
- Premono, M.E., Moawad, A.M., & Vlek, P.L. (1996). Effect of phosphate-solubilizing *Pseudomonas putida* on the growth of maize and its survival in the rhizosphere. *Indonesian Journal of Crop Science*, 11(1), 13-23.
- Radwan, T., Mohamed, Z., & Reis, V. (2004). Aeração e adição de sais na produção de ácido indol acético por bactérias diazotróficas. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 40(10), 997-1004.
- Ramirez, C.A. & Kloepper, J.W. (2011). Rizobacterias promotoras de crecimiento vegetal. En L.M. Hoyos, (Ed), Enfermedades de plantas: Control biológico (pp. 97-120). Bogotá: Carvajal
- Ramírez, H. (2011). *¿De qué hablan cuando dicen materia seca?*. Recuperado el 20 de septiembre de 2013, del sitio web: http://www.produccion-animal.com.ar/tablas_composicion_alimentos/42-Materia_Seca.pdf

- Red de Acción en Plaguicidas y sus Alternativas para América Latina. (2010). *Contaminación y Eutrofización del agua*. Montevideo: RAP-AL Uruguay.
- Rocalba (2005). *Semillas forrajeras y pratenses*. Barcelona: Rocalba S.A.
- Rodríguez, H., & Fraga, R. (1999). Phosphate solubilizing bacteria and their role in plant growth promotion. *Biotechnology Advances*, 17(4-5), 319-339.
- Rosello, J.M., & Fernández, M. (Eds.). (1993). *Guía técnica para ensayos de variedades de campo*. Roma: FAO.
- Rubio, J.E.(2011). *Caracterización molecular y funcional de bacterias del género Azotobacter aisladas de suelos de la República Argentina. El rol de las auxinas en la respuesta a la inoculación de Trigo* (Tesis de maestría). Universidad de Buenos Aires. Buenos Aires, Argentina.
- Saharan, B.S. & Nehra, V. (2011). Plant growth promoting rhizobacteria: A critical review. *Life Sciences and Medicine Research*, 2011(21), 1-30.
- Salamanca, R. (1990). *Suelos y Fertilizantes*. Bogotá: Universidad Santo Tomás.
- Sala, O., Parton, W., Joyce, L., & Lauenroth, K. (1988). Primary production of the central grassland regions of the United States. *Ecological Society of America*, 69(1), 40-45.
- Saikia, S., & Vanita, J. (2007). Biological Nitrogen fixation with non-legumes an achievable target or a dogma?. *Current Science*, 92(3), 317-322.
- Sanchez, D. (2011). *Efecto de la inoculación con bacterias promotoras de crecimiento vegetal sobre el cultivo de tomate (Solanum lycopersicum Var. Sofia) bajo invernadero* (Tesis de pregrado). Pontificia Universidad Javeriana, Bogotá, Colombia.
- Sánchez, L., & Villaneda, E. (2009). *Renovación Y Manejo de Praderas en Sistemas de Producción de Leche especializada en el Trópico Alto Colombiano*. Tibaitatá: Produmedios.
- Santillana, N., Arellano, C., & Zuñiga, D. (2005). Capacidad de Rhizobium de Promover el Crecimiento en Plantas de Tomate (*Lycopersicon esculentum* Miller). *Ecología Aplicada*, 4(1-2), 47-51.
- Santillana, N. (2006). Producción de biofertilizantes utilizando *Pseudomonas* sp. *Ecología Aplicada*, 5(2), 87-91.
- Sarabia, M., Madrigal, R., Martínez, M., & Carreón, Y. (2010). Plantas, hongos micorrízicos y bacterias: su compleja red de interacciones. *Biológicas*, 12(1), 65-71.

- Schippers, B., Bakker, A., & Bakker, A. (1987). Interactions of deleterious and beneficial rhizosphere microorganisms and the effect of cropping practices. *Annual Review of Phytopathology*, 25(9), 339-358.
- Schoebitz, M.I. (2006). *Aislamiento y caracterización de bacterias promotoras de crecimiento vegetal de la rizosfera de Lolium perenne L. de suelo volcánico (modelo género Azospirillum spp)*. (Trabajo de licenciatura). Universidad Austral de Chile. Valdivia, Chile.
- Scragg, A. (2000). *Biología para ingenieros, sistemas biológicos en procesos tecnológicos*. Mexico D.F: Editorial Limusa.
- Semmartin, M., Di Bella, C., & García de Salamone, I.E. (2010). Grazing-induced changes in plant species composition affect plant and soil properties of grassland mesocosms. *Plant and Soil*, 328(2), 471-481.
- Senior, P.J., & Dawes, E.A (1973). The regulation of poly- β -hydroxy butyrate metabolism in *Azotobacter beijerinckii*. *Journal Biochemical*, 134(1), 225-238.
- Sessitsch, A., Howieson, J.G., Perret, X., Antoun, H., & Martinez, E. (2002). Advances in *Rhizobium* Research. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 21(4), 323-378.
- Sharma, S., Kumar, V., & Tripathi, R.B. (2011). Isolation of phosphate solubilizing microorganism (PSMs) from soil. *Journal of Microbiology and Biotechnology Research*, 1(2), 90-95.
- Shenoy, V., & Kalagudi, G.M. (2005). Enhancing plant phosphorus use efficiency for sustainable cropping. *Biotechnology Advances*, 23(8), 501-513.
- Sierra, J. (2002). Fertilización de Pastos y Forrajes de Clima Frío. En SENA, SAC, & FONADE. (Eds.), *Curso Manejo Integrado de Pastos y Conservación de Forrajes* (pp. 43-61). Bogotá: Produmedios.
- Silva, J.V. (2001). *Manual Técnico de Pastos y Forrajes*. San Juan de Pasto, Nariño: Produmedios.
- Sundara, R. & Sinha, M. (1963). Organisms phosphate solubilizers in soil. *Soil Science and Plant Nutrition*, 9, 45-49.
- Taiz, L., & Zeiger, E. (2006). *Fisiología Vegetal*. Castello de la Plana: Publications de la Universitat Jaume I.

- Takahashi, S., & Anwar, M. (2007). Wheat grain yield, phosphorus uptake and soil phosphorus fraction after 23 years of annual fertilizer application to Andosol. *Field Crops Research*, 101(2), 160-171.
- Texeira, M., Soares, I., & Vieire, R. (2005). *Diversidade de Bactérias Endofíticas na Cultura da Mandioca*. Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento 33. Brasil: Embrapa.
- Tislade, S.L, Nelson, W.L., & Beaton, J.D. (1985). *Soil fertility and fertilizers*. New York: MacMillan.
- Tortora, G., Funke, B., & Case, C. (2007). *Introducción a la microbiología*. (9a ed.). Buenos Aires, Argentina: Médica Panamericana S.A.
- Tsavkelova, EA., Klimova, SY., Cherdyntseva, TA., & Netrsov, AL. (2006). Microbial producers of plant growth stimulators and their practical use: a review. *Applied Biochemistry and microbiology*, 42(2), 117-126.
- UMATA. (s.f). *Plan local Ambiental Agropecuario*. Recuperado el 16 de Septiembre de 2012, del sitio web Municipio de Nemocón: <http://www.nemocondinamarca.gov.co/index.shtml>
- Useche, Y.M., Valencia, H., & Pérez, H. (2004). Caracterización de bacterias y hongos solubilizadores de fosfato bajo tres usos de suelo en el sur del trapezio Amazónico. *Acta Biológica Colombiana*, 9(2), 42-45.
- Utkhede, R., Koch, C., & Menzies, J. (1999). Rhizobacterial growth and yield promotion of cucumber plants inoculated with *Pythium aphanidermatum*. *Canadian Journal of Plant Pathology*, 21(3), 265-271.
- Van Peer, R. V., Niemann, G.J., & Schippes, B. (1991). Induced resistance and phytoalexin accumulation in biological control of *Fusarium* wilt of carnation by *Pseudomonas* sp strain WCS417r. *Phytopathology*, 81(7), 728-734.
- Valencia, H. (2010). *Manual de Prácticas de Microbiología del Suelo*. Bogotá: Editorial Universidad Nacional de Colombia.
- Valero. N. (2003) *Potencial Biofertilizante de bacterias Diazótrofas y Solubilizadoras de Fosfatos Asociadas al Cultivo de Arroz (Oryza sativa L.)* (Tesis de maestría). Universidad Nacional de Colombia. Bogotá, Colombia.
- Vandenhove, H., Merckxr, R., Van Steenbergem, M. & Vlassak, K. (1993). Microcalorimetric characterization, physiological stages and survival ability of *Azopirillum brasilense*. *Soil Biology & Biochemistry*, 5(4), 513-519.

- Velásquez, P. (2009) *Evaluación morfoagronómica y nutricional de cinco variedades de Rye Grass bianual (Lolium multiflorum) en lugares representativos de las zonas de producción de leche de las provincias de Carchi, Imbabura y Pichincha* (Tesis de pregrado). Escuela Politécnica Nacional. Quito, Ecuador.
- Villa, M.P., Frías, A. & González, G. (2005). Evaluación de cepas de *Pseudomonas* sp para el control de hongos fitopatógenos que afectan cultivos de interés económico. *ICIDCA*, 39(3), 40-44.
- Whipps, J.M. (2001). Microbial interactions and biocontrol in the rhizosphere. *Journal of Experimental Botany*, 52(1), 487-511.
- Zaied K.A., El-Diasty Z.M., Abd El-Rhman M.M., & El-Sanossy A.S.O. (2009). Effect of horizontal DNA transfer between *Azotobacter* strains on protein patterns of *Azotobacter* transconjugants and biochemical traits in bioinoculated okra (*Abelmoschus Esculentus*, L.) *Australian Journal of Basic and Applied. Sciences*, 3(2), 748-760.
- Zhao, Y. (2010). Auxin Biosynthesis and its Role in Plan Development. *Annual Review Of Plant Biology*, 61(6), 49-64.

ANEXO A. COMPOSICIÓN MEDIO SRSM

| | |
|----------------------------------|----------|
| Sulfato de amonio | 0.5 gr |
| Cloruro de potasio | 0.2 gr |
| Sulfato de magnesio | 0.3 gr |
| Sulfato de manganeso | 0.004 gr |
| Sulfato de hierro heptahidratado | 0.002 gr |
| Cloruro de sodio | 0.2 gr |
| Glucosa | 10 gr |
| Extracto de levadura | 0.5 gr |
| Purpura de bromocresol | 0.1gr |
| Fosfato tricálcico | 5 gr |
| pH 7.2 | |

* Composición en gramos por litro

Fuente: Protocolo siembra eco

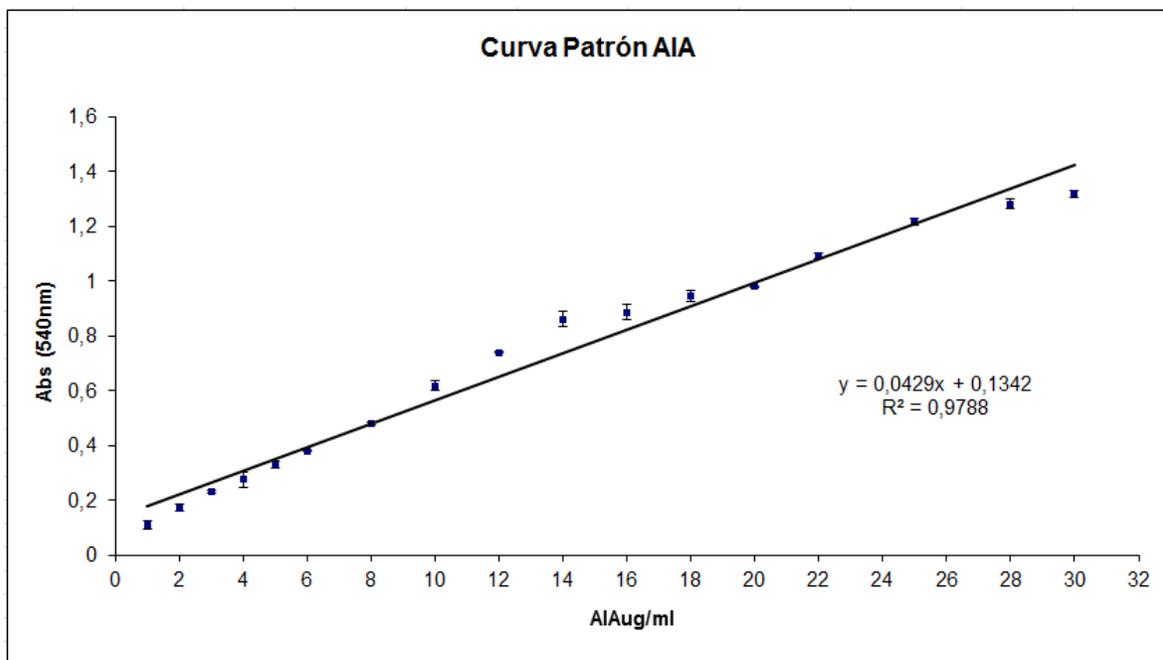
ANEXO B. COMPOSICIÓN MEDIO LGI

| | |
|-----------------------------------|----------|
| Azúcar | 5 gr |
| Fosfato dibásico de potasio | 0,6 gr |
| Fosfato monobásico de potasio | 0,2 gr |
| Sulfato de magnesio dihidratado | 0,2 gr |
| Cloruro de calcio dihidratado | 0,02 gr |
| Molibdato de disodico dihidratado | 0,002 gr |
| Cloruro de sodio | 0,1 gr |
| Azul de bromotimol | 5 mL |
| FeEDTA (1,64%) | 4 mL |
| Solución de vitaminas | 1 mL |
| pH 6.0-6.2 | |

*Composición por litro

Fuente: Protocolo siembra eco

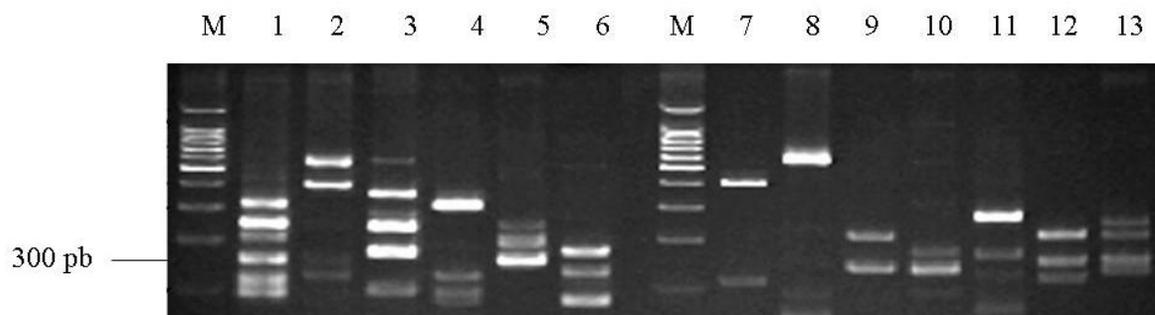
ANEXO C. CURVA PATRÓN AIA



ANEXO D. ELECTROFORESIS EN GEL DE AGAROSA AL 1% PARA LA CEPA C16 (*Pseudomonas sp*)

File: Mao 01 - Sample: C16

11/06/13 macrogen. Pi. Daniel Rojas

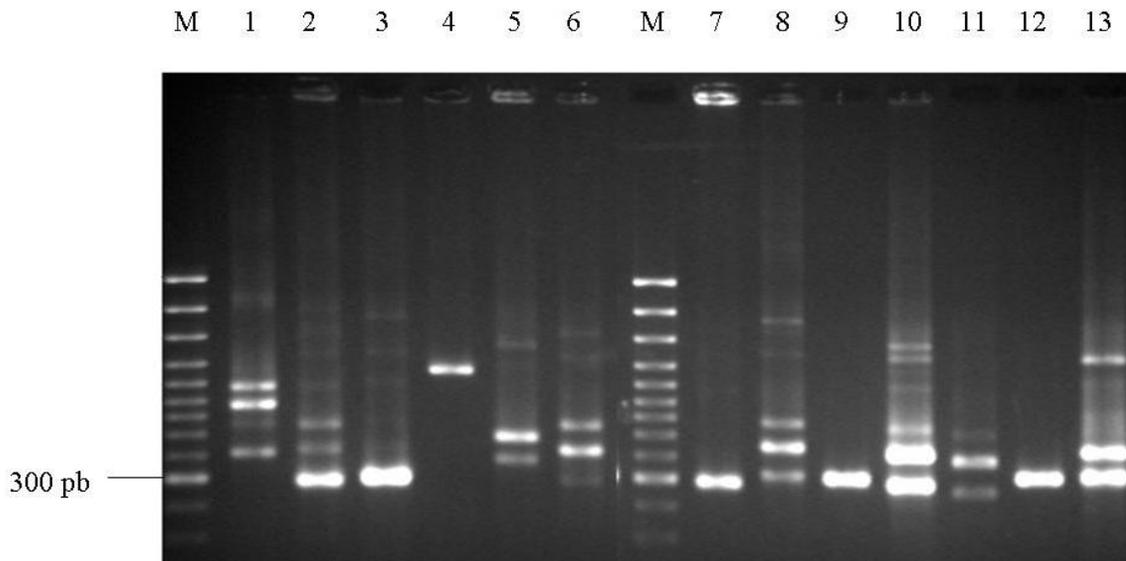


Producto de PCR, correspondiente a un fragmento del gen 16s. Pocillos 1 al 5 y 9, 10 y 12. Amplificación de aislamientos de la rizosfera correspondiente a los pastos Kikuyo (*Pennisetum clandestinum*) y Ryegrass (*Lolium sp*)

ANEXO E. ELECTROFORESIS EN GEL DE AGAROSA AL 1% PARA LA CEPA A15 (*Azotobacter* sp)

File: Mao 01 - Sample: A15

11/06/13 macrogen Pi. Daniel Rojas



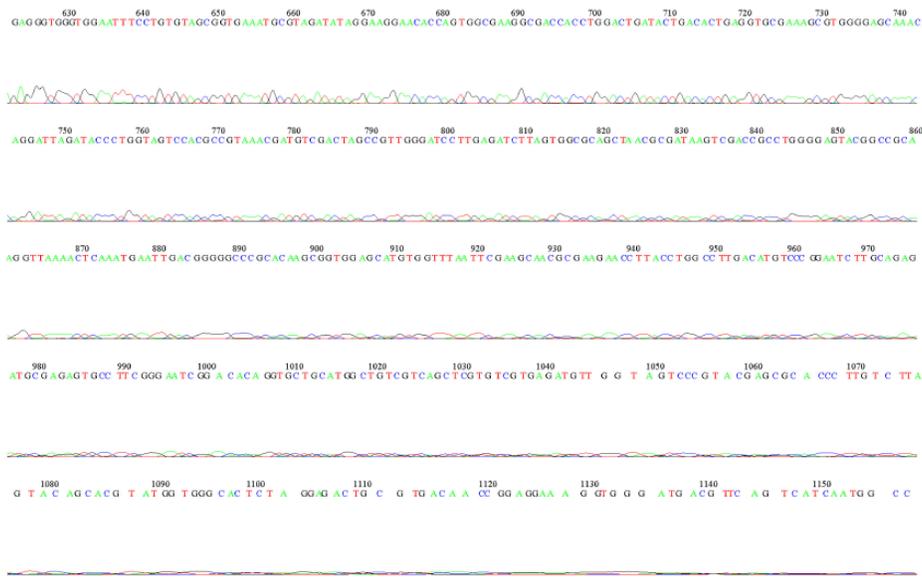
Producto de PCR, correspondiente a un fragmento del gen 16s. Pociños 2, 3 y 7 al 13. Amplificación de aislamientos de la rizosfera correspondiente a los pastos Kikuyo (*Pennisetum clandestinum*) y Ryegrass (*Lolium* sp.)

File: MA01 Run Ended: 2013/06/11 21:43 Signal G:2597 A:3541 C:6657 T:7798
Sample: A15 Lane: 15 Base spacing: 15.418934 1373 bases in 16301 scans Page 2 of 2



ANEXO G. ELECTROFEROGRAMA OBTENIDO A PARTIR DE LA SECUENCIA DEL GEN RDNA 16S PARA LA CEPA C16





ANEXO H. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

PESO FRESCO PARTE ÁEREA

Pruebas de normalidad

| | tratamientos | Kolmogorov-Smirnov ^a | | | Shapiro-Wilk | | |
|--------|--------------------------|---------------------------------|----|------|--------------|----|------|
| | | Estadístico | gl | Sig. | Estadístico | gl | Sig. |
| Fresco | T_ABSOLUTO | ,250 | 4 | . | ,944 | 4 | ,677 |
| | T_QUIMICO | ,246 | 4 | . | ,957 | 4 | ,759 |
| | INOCULACION_CEPA_FB N | ,254 | 4 | . | ,911 | 4 | ,489 |
| | INOCULACION_CEPA_CS F | ,246 | 4 | . | ,963 | 4 | ,798 |
| | FBN_QUIMICO_P | ,250 | 4 | . | ,953 | 4 | ,734 |
| | CSF_QUIMICO_N | ,248 | 4 | . | ,953 | 4 | ,733 |
| | FBN_CSF | ,258 | 4 | . | ,955 | 4 | ,750 |

a. Corrección de la significación de Lilliefors

Se comprueba una distribución normal a través de la prueba de Shapiro-Wilk

Prueba de homogeneidad de varianzas

PESOFRESCO

| Estadístico de Levene | gl1 | gl2 | Sig. |
|-----------------------|-----|-----|------|
| ,486 | 6 | 21 | ,811 |

Se evidencia la presencia de Homogeneidad de varianzas a través de la prueba de Levene

ANDEVA

PESOFRESCO

| | Suma de cuadrados | gl | Media cuadrática | F | Sig. |
|--------------|-------------------|----|------------------|-------|------|
| Inter-grupos | 450092,857 | 6 | 75015,476 | 1,077 | ,408 |
| Intra-grupos | 1463375,000 | 21 | 69684,524 | | |
| Total | 1913467,857 | 27 | | | |

El análisis de varianza de una vía evidencia que no existen diferencias significativas entre los tratamientos

PESO SECO PARTE ÁREA

Pruebas de normalidad

| | tratamientos | Kolmogorov-Smirnov ^a | | | Shapiro-Wilk | | |
|----------|--------------------------|---------------------------------|----|------|--------------|----|------|
| | | Estadístico | gl | Sig. | Estadístico | Gl | Sig. |
| Pesoseco | T_ABSOLUTO | ,250 | 4 | ,953 | ,953 | 4 | ,734 |
| | T_QUIMICO | ,271 | 4 | ,848 | ,848 | 4 | ,220 |
| | INOCULACION_CEPA_FB N | ,258 | 4 | ,955 | ,955 | 4 | ,750 |
| | INOCULACION_CEPA_CS F | ,256 | 4 | ,899 | ,899 | 4 | ,426 |
| | FBN_QUIMICO_P | ,262 | 4 | ,831 | ,831 | 4 | ,170 |
| | CSF_QUIMICO_N | ,250 | 4 | ,961 | ,961 | 4 | ,783 |
| | FBN_CSF | ,234 | 4 | ,970 | ,970 | 4 | ,841 |

a. Corrección de la significación de Lilliefors

Se comprueba una distribución normal a través de la prueba de Shapiro-Wilk

Prueba de homogeneidad de varianzas

PESOSECO

| Estadístico de Levene | gl1 | gl2 | Sig. |
|-----------------------|-----|-----|------|
| ,968 | 6 | 21 | ,470 |

Se evidencia la presencia de Homogeneidad de varianzas a través de la prueba de Levene

ANDEVA

PESOSECO

| | Suma de cuadrados | gl | Media cuadrática | F | Sig. |
|--------------|-------------------|----|------------------|-------|------|
| Inter-grupos | 524950,000 | 6 | 87491,667 | 4,793 | ,003 |
| Intra-grupos | 383375,000 | 21 | 18255,952 | | |
| Total | 908325,000 | 27 | | | |

El análisis de varianza de una vía evidencia que existen diferencias significativas entre los tratamientos

Tukey

| TRATAMIENTOS | N | Subconjunto para alfa = 0.05 | |
|----------------------|---|------------------------------|--------|
| | | 1 | 2 |
| FBN_CSF | 4 | 282,50 | |
| INOCULACION_CEPa_FBN | 4 | 332,50 | |
| FBN_QUIMICO_P | 4 | 367,50 | |
| T_ABSOLUTO | 4 | 450,00 | 450,00 |
| INOCULACION_CEPa_CSF | 4 | 467,50 | 467,50 |
| CSF_QUIMICO_N | 4 | 500,00 | 500,00 |
| T_QUIMICO | 4 | | 732,50 |
| Sig. | | ,300 | ,090 |

Se muestran las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.

a. Usa el tamaño muestral de la media armónica = 4,000.

La prueba de Tukey muestra que las principales diferencias dividen a los tratamientos en dos grupos, en el primero de ellos se incluyen todos los tratamientos con valores menores a excepción del Tratamiento químico, mientras que en el segundo grupo, solo se incluye al tratamiento absoluto, la inoculación cepa CSF, el CSF químico N y el tratamiento químico con los valores mayores.

PORCENTAJE DE MATERIA SECA PARTE AÉREA

Pruebas de normalidad

| | | |
|--------------|---------------------------------|--------------|
| tratamientos | Kolmogorov-Smirnov ^a | Shapiro-Wilk |
|--------------|---------------------------------|--------------|

| | | Estadístico | gl | Sig. | Estadístico | Gl | Sig. |
|----------|--------------------------|-------------|----|------|-------------|----|------|
| Pesoseco | T_ABSOLUTO | ,198 | 4 | . | ,985 | 4 | ,930 |
| | T_QUIMICO | ,278 | 4 | . | ,943 | 4 | ,674 |
| | INOCULACION_CEPa_FB N | ,292 | 4 | . | ,931 | 4 | ,602 |
| | INOCULACION_CEPa_CS F | ,280 | 4 | . | ,939 | 4 | ,648 |
| | FBN_QUIMICO_P | ,242 | 4 | . | ,939 | 4 | ,647 |
| | CSF_QUIMICO_N | ,249 | 4 | . | ,960 | 4 | ,777 |
| | FBN_CSf | ,265 | 4 | . | ,927 | 4 | ,574 |

a. Corrección de la significación de Lilliefors

Se comprueba una distribución normal a través de la prueba de Shapiro-Wilk

Prueba de homogeneidad de varianzas
PORCENTAJEMATERIASECA

| Estadístico de Levene | gl1 | gl2 | Sig. |
|-----------------------|-----|-----|------|
| ,956 | 6 | 21 | ,478 |

Se evidencia la presencia de Homogeneidad de varianzas a través de la prueba de Levene

ANDEVA de un factor

| | Suma de cuadrados | gl | Media cuadrática | F | Sig. |
|--------------|-------------------|----|------------------|-------|------|
| Inter-grupos | 1797,086 | 6 | 299,514 | 5,383 | ,002 |
| Intra-grupos | 1168,353 | 21 | 55,636 | | |
| Total | 2965,439 | 27 | | | |

El análisis de varianza de una vía evidencia que existen diferencias significativas entre los tratamientos

PORCENTAJE MATERIASECA

Tukey

| TRATAMIENTOS | N | Subconjunto para alfa = 0.05 | |
|--------------------------|---|------------------------------|---------|
| | | 1 | 2 |
| INOCULACION_CEPa_FB N | 4 | 26,3375 | |
| FBN_CSf | 4 | 29,0350 | |
| FBN_QUIMICO_P | 4 | 30,5875 | |
| T_ABSOLUTO | 4 | 35,3525 | 35,3525 |
| INOCULACION_CEPa_CS F | 4 | 37,8450 | 37,8450 |
| CSF_QUIMICO_N | 4 | 38,8975 | 38,8975 |
| T_QUIMICO | 4 | | 52,3175 |
| Sig. | | ,254 | ,054 |

Se muestran las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.

a. Usa el tamaño muestral de la media armónica = 4,000.

La prueba de Tukey muestra que las principales diferencias dividen a los tratamientos en dos grupos, en el primero de ellos se incluyen todos los tratamientos con valores menores a excepción del Tratamiento químico, mientras que en el segundo grupo, solo se incluye al tratamiento absoluto, la inoculación cepa CSF, el CSF químico N y el tratamiento químico con los valores mayores.

PESO FRESCO PARTE RADICULAR

Pruebas de normalidad

| | Tratamientos | Kolmogorov-Smirnov ^a | | | Shapiro-Wilk | | |
|------------|--------------------------|---------------------------------|----|------|--------------|----|------|
| | | Estadístico | gl | Sig. | Estadístico | gl | Sig. |
| Pesofresco | T_ABSOLUTO | ,258 | 4 | | ,955 | 4 | ,750 |
| | T_QUIMICO | ,260 | 4 | | ,827 | 4 | ,161 |
| | INOCULACION_CEPA_FB N | ,250 | 4 | | ,953 | 4 | ,734 |
| | INOCULACION_CEPA_CS F | ,262 | 4 | | ,936 | 4 | ,631 |
| | FBN_QUIMICO_P | ,250 | 4 | | ,945 | 4 | ,683 |
| | CSF_QUIMICO_N | ,250 | 4 | | ,945 | 4 | ,683 |
| | FBN_CSF | ,370 | 4 | | ,770 | 4 | ,058 |

a. Corrección de la significación de Lilliefors

Se comprueba una distribución normal a través de la prueba de Shapiro-Wilk

Prueba de homogeneidad de varianzas

Pesofresco

| Estadístico de Levene | gl1 | gl2 | Sig. |
|-----------------------|-----|-----|------|
| 2,512 | 6 | 21 | ,054 |

Se evidencia la presencia de Homogeneidad de varianzas a través de la prueba de Levene

ANDEVA de un factor

Pesofresco

| | Suma de cuadrados | gl | Media cuadrática | F | Sig. |
|--------------|-------------------|----|------------------|-------|------|
| Inter-grupos | 111429,374 | 6 | 18571,562 | 1,063 | ,415 |
| Intra-grupos | 367032,358 | 21 | 17477,731 | | |
| Total | 478461,731 | 27 | | | |

El análisis de varianza de una vía evidencia que no existen diferencias significativas entre los tratamientos

PESO SECO PARTE RADICULAR

Pruebas de normalidad

| | tratamientos | Kolmogorov-Smirnov ^a | | | Shapiro-Wilk | | |
|----------|--------------------------|---------------------------------|----|------|--------------|----|------|
| | | Estadístico | gl | Sig. | Estadístico | gl | Sig. |
| Pesoseco | T_ABSOLUTO | ,250 | 4 | . | ,945 | 4 | ,683 |
| | T_QUIMICO | ,260 | 4 | . | ,827 | 4 | ,161 |
| | INOCULACION_CEPa_FB N | ,250 | 4 | . | ,945 | 4 | ,683 |
| | INOCULACION_CEPa_CS F | ,271 | 4 | . | ,848 | 4 | ,220 |
| | FBN_QUIMICO_P | ,271 | 4 | . | ,848 | 4 | ,220 |
| | CSF_QUIMICO_N | ,250 | 4 | . | ,953 | 4 | ,734 |
| | FBN_CSF | ,230 | 4 | . | ,973 | 4 | ,860 |

a. Corrección de la significación de Lilliefors

Se comprueba una distribución normal a través de la prueba de Shapiro-Wilk

Prueba de homogeneidad de varianzas

PESOSECO

| Estadístico de Levene | gl1 | gl2 | Sig. |
|-----------------------|-----|-----|------|
| ,634 | 6 | 21 | ,701 |

Se evidencia la presencia de Homogeneidad de varianzas a través de la prueba de Levene

ANDEVA

Pesoseco

| | Suma de cuadrados | gl | Media cuadrática | F | Sig. |
|--------------|-------------------|----|------------------|------|------|
| Inter-grupos | 8271,429 | 6 | 1378,571 | ,605 | ,723 |
| Intra-grupos | 47825,000 | 21 | 2277,381 | | |
| Total | 56096,429 | 27 | | | |

El análisis de varianza de una vía evidencia que NO existen diferencias significativas entre los tratamientos

PORCENTAJE DE MATERIA SECA PARTE RADICULAR

Pruebas de normalidad

| | Tratamientos | Kolmogorov-Smirnov ^a | | | Shapiro-Wilk | | |
|------------|--------------------------|---------------------------------|----|------|--------------|----|------|
| | | Estadístico | gl | Sig. | Estadístico | gl | Sig. |
| Porcentaje | T_ABSOLUTO | ,268 | 4 | . | ,843 | 4 | ,203 |
| | T_QUIMICO | ,273 | 4 | . | ,852 | 4 | ,233 |
| | INOCULACION_CEPa_FB N | ,303 | 4 | . | ,898 | 4 | ,419 |
| | INOCULACION_CEPa_CS F | ,218 | 4 | . | ,970 | 4 | ,844 |
| | | | | | | | |

| | | | | | |
|---------------|------|---|------|---|------|
| FBN_QUIMICO_P | ,317 | 4 | ,909 | 4 | ,478 |
| CSF_QUIMICO_N | ,270 | 4 | ,865 | 4 | ,278 |
| FBN_CSF | ,200 | 4 | ,985 | 4 | ,930 |

a. Corrección de la significación de Lilliefors

Se comprueba una distribución normal a través de la prueba de Shapiro-Wilk

Prueba de homogeneidad de varianzas

PORCENTAJE

| Estadístico de Levene | gl1 | gl2 | Sig. |
|-----------------------|-----|-----|------|
| 1,246 | 6 | 21 | ,323 |

Se evidencia la presencia de Homogeneidad de varianzas a través de la prueba de Levene

ANDEVA

PORCENTAJE

| | Suma de cuadrados | gl | Media cuadrática | F | Sig. |
|--------------|-------------------|----|------------------|-------|------|
| Inter-grupos | 479,062 | 6 | 79,844 | 3,383 | ,017 |
| Intra-grupos | 495,561 | 21 | 23,598 | | |
| Total | 974,623 | 27 | | | |

El análisis de varianza de una vía evidencia que no existen diferencias significativas entre los tratamientos