

**EVALUACION DE CRECIMIENTO EN TALLO Y RAIZ INOCULANDO
Azotobacter sp. COMO BACTERIA FIJADORA DE NITROGENO, EN
CULTIVOS DE ARVEJA (*Pisum Sativum*), ETAPA 1**

TRABAJO DE GRADO

Presentado por:
Angie Geraldine Enciso Torres
Jordan Smith Rico Sabogal

Director:
Andrés Felipe Molano

UNIVERSIDAD ECCI
FACULTAD INGENIERIA AMBIENTAL
BOGOTÁ D.C.

2016

TABLA DE CONTENIDO

RESUMEN	5
PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN	6
OBJETIVOS	8
GENERAL	8
ESPECÍFICOS	8
PREGUNTA	9
JUSTIFICACION	10
I MARCO TEORICO	11
II MARCO HISTORICO	13
III MARCO LEGAL	14
IV MARCO METODOLOGICO	15
IV.I DISEÑO METODOLOGICO	16
IV.I.I Localización	17
V RESULTADOS Y ANALISIS	21
V.I AISLAMIENTO AZOTOBACTER	21
V.II IDENTIFICACIÓN MACROSCOPICA	22
V.III IDENTIFICACION MICROSCOPICA	23
VI DETERMINACIÓN DE PARÁMETROS FÍSICOQUÍMICOS	24
VI.I Textura	24
VI.II Color	25
VI.III PH	26
VI.IV NITROGENO	26
VI.V FOSFORO	27
VI.VI CALDOS Y CINÉTICA DE CRECIMIENTO	27

VII CRECIMIENTO EN BANCO DE SEMILLAS.....	32
VIII CONCLUSIONES	36
IX LISTA DE TABLAS	37
X LISTA DE IMAGENES.....	37
X LISTA DE GRAFICAS.....	38
BIBLIOGRAFÍA	39

INTRODUCCION

La arveja (*Pisum sativum*) es una de las principales leguminosas cultivadas en el mundo y una de las de mayor impacto económico. El aumento de la productividad es importante para la rentabilidad del cultivo, sin embargo, ésta se ve afectada por diversos factores limitantes como la baja fertilidad del suelo, siendo necesaria la aplicación de nitrógeno (N) considerado un macronutriente, para asegurar el rendimiento adecuado. Los suelos tienen cantidades de nitrógeno muy superiores a las requeridas por los cultivos, sin embargo, casi todo este elemento se encuentra en la materia orgánica y anualmente sólo se mineralizan 1 a 3% del nitrógeno total (Ardila, 2007). El nitrógeno es el motor del crecimiento de las plantas. Como constituyente esencial de las proteínas, participa en todos los procesos principales de crecimiento de las plantas. Es un elemento constitutivo de los aminoácidos y de los ácidos nucleicos, proteínas, clorofila y de numerosas sustancias secundarias como los alcaloides (Red Agrícola 2013).

Los fertilizantes químicos han sido benéficos para el sector agrícola; no obstante, el abuso de estos productos genera residuos que producen salinización, problemas en el drenaje, compactación del suelo y disminución de la actividad microbiana comprometida en la nutrición vegetal. Cada año se incrementa la cantidad de fertilizantes aplicados debido a la menor eficiencia de absorción en el suelo y absorción por la planta, aumentando los costos de producción. Así mismo se genera un problema ambiental debido a la producción de gases tóxicos que se desprenden de los fertilizantes como los óxidos de nitrógeno que dañan la capa de ozono (Lara, et al; 2007).

Como una alternativa a los fertilizantes químicos está la posibilidad de utilizar bacterias del suelo, que como parte de su metabolismo incrementan la fertilidad y benefician a las plantas, por lo que se les ha denominado promotoras del crecimiento de las plantas. Entre sus actividades está la fijación de nitrógeno, solubilización de fosfatos, producción de hormonas, antibióticos y otros compuestos de importancia para el desarrollo de los cultivos (Escobar 2011). Los biofertilizantes son tecnologías limpias apropiadas dentro de los esquemas de certificación nacional e internacional, porque ofrecen soluciones a problemas deficientes de nutrientes en el suelo. Permiten reemplazar los fertilizantes de síntesis con restricciones para uso en tecnologías limpias, contribuyen con la disminución de costos de producción y son compatibles con la protección al ambiente (Restrepo 2015).

Estas bacterias fijadoras de nitrógeno y otros microorganismos usados en la fertilización de los suelos agrícolas constituyen los biofertilizantes, y aunque existen algunos que son comercializados, se prefiere el uso de microorganismos propios de los suelos donde van a ser utilizados. Por lo expuesto, se realizó el presente estudio, cuyos objetivos fueron aislar y caracterizar cepas nativas de *Azotobacter sp.*, en cultivos de leguminosas, así como determinar el desarrollo del cultivo de arveja en su crecimiento.

RESUMEN

El crecimiento del sector agrícola en Colombia ha disminuido, no ha incrementado la demanda debido a que el Gobierno Nacional no ha invertido suficiente, ha habido un incremento en la demografía mayor a la que se efectúa en la oferta de alimentos conduciendo a guerras cíclicas por el recurso escaso y el sector agrícola no muestra evolución que incremente la economía del país (Finagro 2014).

En Colombia el suelo es utilizado y tratado con agro fertilizantes y fertilizantes con base a nitrógeno, estos pueden ser la urea, Amonios, Dióxidos de Nitrógeno, entre otros afectando la calidad ambiental del suelo (Escobar 2011). Este estudio pretende determinar el efecto de las cepas nativas de *Azotobacter* sp. sobre el crecimiento vegetativo en tallo y raíz de arveja (*Pisum sativum*), como una alternativa al uso indiscriminado de fertilizantes químicos, tomando muestras de raíces y rizósfera del suelo. Sembrando el cultivo y analizando el crecimiento mediante cepas en medio sólido como agente *Azotobacter* y Ashby incubando a 34°C. Luego procediendo a llevarlo a una dilución en caldo Ashby en shaker mezclándolo durante quince días para luego inocularlas al suelo con la planta en crecimiento.

La revisión bibliográfica disponible en Colombia demostró que los estudios sobre las leguminosas son relativamente escasos (Forero; et al; 2005). Este estudio se realizó partir de las leguminosas (*Pisum sativum*), siendo esta uno de los mayores grupos de plantas alimentarias que requiere el nitrógeno como fertilizante para su crecimiento y producir una alta demanda en el mercado.

El *Azotobacter* sp., es una bacteria Gram negativa utilizada en este estudio como una biotecnología alternativa a los fertilizantes químicos, para brindarle nitrógeno a las leguminosas y fermentarlas sin necesidad de utilizar un agente químico. Esta bacteria tiene la capacidad de crear un medio libre de nitrógeno que resulta muy beneficioso para las plantas ya que también puede controlar enfermedades de las plantas debido a los subproductos que generan. (Wilson 1943).

PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN

Durante años los fertilizantes han reinventado la industria agrícola, ya que ofrecen aparentemente grandes beneficios en poco tiempo que le permiten al agricultor obtener mayores resultados y producir mayores cantidades de alimentos, reduciendo el tiempo de espera que hay entre cultivo y cultivo, pero esto no es tan cierto como se da a conocer. El nitrógeno es uno de los componentes principales para la producción de uno de los fertilizantes más usados en todo el mundo y específicamente en Colombia, la Urea contiene 46% aproximadamente de nitrógeno sólido, ya que este es uno de los nutrientes más importantes para el crecimiento y germinación del cultivo (Fertiberia 2014).

Es importante resaltar que las plantas son capaces de sintetizar cierto porcentaje de sustancias que toman como alimento, partiendo de los elementos químicos que consiguen a través de medios como el suelo, el aire y el agua, estos se dividen en: macronutrientes, micronutrientes y oligoelementos, los más importantes dentro de esta son los macro elementos, y estos a su vez están subdivididos por macro elementos primarios y macro elementos secundarios, en donde incluyen nutrientes como lo son el nitrógeno, fósforo, calcio, magnesio y azufre, los cuales son tomados en forma natural por las raíces de la planta. (Redacción Ambientum 2000)

En el caso del nitrógeno, es uno de los nutrientes más importantes y que componen todas las proteínas, las plantas lo absorben en forma de Ion Nitrito e Ion Amonio, cuando este se suministra de manera excesiva como se suelen hacer para obtener una producción más rápida, incide en el pH del suelo, disminuyéndolo, en el caso contrario si el fertilizante nitrogenado viene combinado con bases como lo son el calcio y el sodio, este aumenta el pH del suelo y también aumenta significativamente la salinidad del suelo. (Redacción Ambientum 2000)

Los abonos de tipo nitrogenado son de cobertura y suelen tener componentes como: magnesio, calcio e incluso micro elementos (Fertiberia 2014), estos interceden en la multiplicación celular, lo que estimula el crecimiento acelerado de la planta, también forma parte de la cadena de proteínas y enzimas que sintetizan las proteínas que forman parte de la fotosíntesis (Molina 2011), generando el crecimiento que la raíz de la planta necesita para absorber el fósforo que se encuentra en el suelo (Molina 2011)

Existen algunas formas de nitrógeno disuelto orgánicamente en el suelo, pero esta no está disponible inmediatamente para que las plantas puedan absorber el suficiente componente. El nitrógeno orgánico se filtra a través de la materia orgánica en descomposición, y luego pasa por un proceso de mineralización, en el cual solo hasta este punto, la planta puede aprovechar el máximo potencial del nitrógeno orgánico que ofrece el suelo, ya que es un proceso largo y poco rentable, los agricultores optan por el fertilizante inorgánico.

Poco a poco la demanda de comida se hace cada vez más difícil de abastecer ya que la población mundial crece de forma exponencial, esto obliga a los agricultores a obtener los alimentos de formas más rápidas y seguras. Pero el problema se hace más evidente con

este tipo de prácticas, ya que la rápida degradación de los suelos es un tema que a simple vista no se toma en cuenta, pero tiene gran incidencia tanto en la parte ambiental, social y económica.

Producir un fertilizante genera elevados desechos líquidos, que van directamente a contaminar el suelo o el agua, además de que estos no son tratados adecuadamente. En Colombia por ejemplo, producir Urea es un proceso caro, comparado a otros países, ya que este tiene como componente secundario el CO₂ o (gas natural). (DANE 2013)

Los fertilizantes tienen altas incidencias ambientales, las condiciones climáticas juegan un papel importante ya sea por medio de la precipitación que aumenta la escorrentía o lixiviación del fertilizante contaminando drenajes subterráneos y superficiales, o por el aumento significativo de la temperatura, volatizando el fertilizante, que a su vez incrementa la cantidad de producto aplicada en el suelo.

Tiene también un componente social, ya que un agricultor pagaría un elevado precio por los fertilizantes que aplica a su cultivo, y su retribución como ganancia no se ve reflejada, y esto hace de los paquetes verdes una lucha continua.

Los agro insumos tienen precios bastante elevados, lo que lleva a los agricultores básicamente a reclamar las alzas considerables de los precios, entre los agro insumos se destacan los fertilizantes, ya que el precio en Colombia comparado con el extranjero es significativamente alto (Correa 2013).

OBJETIVOS

GENERAL

Aislar e identificar *Azotobacter sp.*, evaluando el efecto del microorganismo inoculado en bancos de semillas de arveja (*Pisum sativum*) respecto al incremento vegetal de tallo y raíz en la planta.

ESPECÍFICOS

Identificar las condiciones que permiten la estimulación del crecimiento de colonias de *Azotobacter sp.*

Reconocer el efecto del carbonato de calcio sobre el crecimiento de la masa bacteriana de *Azotobacter sp.*

Evaluar el crecimiento de tallo y raíz en los bancos de semillas de arveja (*Pisum sativum*).

PREGUNTA

¿*Azotobacter sp.*, que es un fijador de nitrógeno no simbiótico, puede mejorar las condiciones vegetativas de raíz y tallo en cultivos de leguminosas?

JUSTIFICACION

La alternativa biotecnológica utilizando microorganismos fijadores de nitrógeno en reemplazo de los fertilizantes químicos es un importante avance biotecnológico, porque mejoran la actividad microbiana natural que esta inerte en el suelo y también mantienen y mejoran los aspectos físicos, químicos y biológicos del suelo (Mojica, 2014). Además de esto sustituyen parcial o completamente los fertilizantes químicos, ya que estos producen serias afectaciones al suelo, que pueden ser evidenciadas a largo plazo en su equilibrio físico y químico (Mojica, 2014).

Existen variados tipos de biofertilizantes que tienen como objetivo general, reemplazar los agro insumos químicos, como lo son el compost, algunos subproductos vegetales y animales, y los que se utilizan agentes microbianos para inocular en el suelo (Mojica, 2014).

En el caso de los microorganismos utilizados como biofertilizantes, ayudan al crecimiento de la planta, le brindan los nutrientes necesarios para su desarrollo óptimo, le ofrece una protección de ciertas enfermedades que pueden atacar a la planta y dañarla tanto interna como externamente y garantizan la productividad sostenible del cultivo (Mojica, 2014).

Son variados los beneficios que tienen los biofertilizantes como por ejemplo que aumentan significativamente los nutrientes y la actividad microbiana del suelo, su precio es considerablemente más bajo, ya que sus compuestos básicos derivan de fuentes renovables, generan a la planta un desarrollo más elevado, entregando fuerza y vitalidad de una forma natural, aumentan la calidad de sus frutos y vitaminas que contienen cada uno, aumentan la mineralización de los alimentos esenciales para que la planta se desarrolle, el producto no se desperdicia, ya que la planta toma los alimentos que necesita y el resto se conserva hasta que se requieran en el proceso, su aplicación disminuye con el tiempo, porque este le brinda al suelo el sustento que necesita a la vez que lo regenera y sobreviva por sí solo.

Mientras que los fertilizantes químicos tienen ciertas desventajas que son letales en la aplicación de suelos, como por ejemplo disminuye el humus e incrementa la acidez y salinidad del suelo, su precio en el mercado depende del precio de los combustibles fósiles, debido a que su materia prima son los hidrocarburos, disminuye la calidad y cantidad de vitaminas que contienen los frutos, genera poca mineralización lo que le causa problemas a la planta a la hora de absorber nutrientes, su sobredosis es toxica dañando no solo el cultivo, sino también el suelo que se contamina, el producto se desperdicia ya que son volátiles y la planta no alcanza a absorberlos antes de que estos se evaporen, la aplicación de estos productos aumentan, conforme el suelo pierde su fertilidad y se hace dependiente. (Mirón; et al 2009)

Pero recientemente este sector toma fuerza cada vez más, ya que empresas grandes que dominan el mercado como lo son Monsanto, están adquiriendo este tipo de biotecnologías, que le dan al sector agrícola una opción más viable y económica, también Corpoica se ha involucrado en el tema, ya que tiene estudios de universidades y empresas que ayudan a

que los biofertilizantes en especial los microorganismos tomen fuerza poco a poco, y brindan nuevas oportunidades de empleo a diferentes personas que se involucran con el tema y realizan investigaciones sobre ello, algunas empresas han empezado a explorar este campo en sus suelos, y viendo que tienen unos buenos resultados casi al mismo tiempo que lo haría un fertilizante químico, pero con menos contaminación y degradación de los suelos. (Restrepo 2015).

I MARCO TEORICO

El suelo como capa superior de la tierra que se sobrepone de la roca sólida, sustrato indispensable para el crecimiento vegetal, formaciones geológicas naturales desarrolladas bajo condiciones muy diversas de clima y materiales de origen, lo cual justifica su continua evolución y en consecuencia su gran variedad (Ginés 2003).

Los fertilizantes son sustancias y nutrientes de forma química asimilables por las raíces de las plantas para incrementar las plantas en el suelo. Estos fertilizantes contienen mezclas químicas artificiales que se aplican al suelo o a las plantas para hacerlo más fértil (Dalia 2012). También se pueden encontrar fertilizantes biológicos que tienen origen vegetal, pero durante su elaboración sufren procesos sintéticos, estos no generan residuos en agua, suelo ni en las plantas. (Aleco 2009).

Los fertilizantes nitrogenados llevan un rápido crecimiento a nivel mundial lo que lleva a la producción y consumo más frecuente. La industria de este tipo de abonos se basa en el amoníaco sintético. A partir de éste, se fabrica nitrato de amonio y urea. Todos los procesos para fabricar amoníaco utilizan aire atmosférico como fuente de nitrógeno. El hidrogeno como sustancia activa en gran parte de los fertilizantes químicos tiene un costo de fabricación elevado, la materia prima se elige con extremado cuidado y su producción no es compleja. (Morel 1971). El nitrógeno se fija consistiendo en la reducción de N_2 a NH_4^+ por la enzima nitrogenasa, después de la fotosíntesis, la ruta metabólica más importante para el mantenimiento de la vida en la Biosfera (Rondon).

Los microorganismos Fijadores de Nitrógeno no constituyen un grupo taxonómico homogéneo, la única característica que comparten es la presencia de la enzima nitrogenasa (Rondon). Dichas bacterias comprenden organismos fototrofos, como bacterias pertenecientes a la familia Rhodospirillaceae, Clorobiaceae y Cianobacteriae; organismos quimioautotrofos, como bacterias de los géneros Thiobacillus, Xanthobacter y Desulfovidrio y organismos heterótrofos como las bacterias pertenecientes a la familia Frankiaceae, al grupo Rhizobiaceae y a los géneros Azotobacter, Enterobacter, Klebsiella y Clostridium (Rondon).

La principal operación química en la obtención de amoníaco es la producción de hidrógeno. Se parte de gas natural o nafta, se elimina el azufre porque contaminaría los catalizadores, y entonces las materias primas entran en el reformador primario, donde hay un catalizador niquelado para la producción de nitrógeno (Morel 1971). El nitrato de amonio comenzó en Europa alrededor de 1917, a escala piloto. Su empleo importante como abono se inició en 1945. En estados Unidos de Norteamérica, su contenido en nitrógeno es de 33,5 por ciento; en Europa de 20, 23 y 26 por ciento como nitrato amónico calcio. Es el principal fertilizante nitrogenado mundial (Morel 1971). La producción de fertilizantes se realiza a través de materias primas como gas, nafta, aceite combustible, carbón, fosfato y sales de potasio (James 2012).

El uso de fertilizantes no siempre será común ya que su producción química ha estado erosionando y acidificando el suelo. Esto lleva a la creación de nuevas tecnologías de biorremediación como los biofertilizantes, siendo una opción para los campesinos que no

fertilizan o lo hacen con pequeñas cantidades, donde se puede reducir aproximadamente hasta 50 por ciento de la fórmula de fertilidad tradicional. El empleo de biofertilizantes en los cultivos agrícolas es una alternativa para reducir la aplicación de fertilizantes químicos y de otros agroquímicos que dañan el medio ambiente, además que resultan un 90 por ciento más baratos para los agricultores. (Suarez 2014). El suelo pasa por un proceso de bioestimulación conteniendo células vivas o latentes de cepas microbianas previamente seleccionadas, que se caracterizan por producir sustancias fisiológicamente activas que al interactuar con la planta promueven o desencadenan diferentes eventos metabólicos en función de estimular el crecimiento, el desarrollo y el rendimiento de cultivos económicos (Suarez 2014).

Es ahí donde intervienen microorganismos que pueden coadyudar a la regeneración del suelo mientras simbióticamente fertiliza el crecimiento de la planta. Una de estos microorganismos es el *Azotobacter sp.* ya que posee un complejo enzimático capaz de reducir el nitrógeno del aire al amonio para ser asimilado por las plantas (Suarez 2014). El *Azotobacter sp.* fijador de nitrógeno aerobio reduce nitratos a óxido nitroso (Furina 2002). En esta fijación de nitrógeno simbiótica las bacterias llevan a cabo la transformación de N_2 a amonio en los nódulos como estructuras distintivas de las leguminosas, ejemplo de microorganismos *Rhizobium sp.* Mediante este mecanismo estas bacterias logran suplir entre el 80 y 100% de las necesidades de nitrógeno en las leguminosas (Ecured 2014). Estas bacterias del género *Bacillus* que tienen la cualidad de producir ácidos orgánicos, enzimas y otras sustancias capaces de solubilizar el fósforo del suelo y ponerlo a disposición de la planta como la Fosforina (Suarez 2014).

II MARCO HISTORICO

La creciente necesidad de incrementar las producciones agrícolas para abastecer la demanda general de alimentos tanto a nivel nacional como a nivel mundial, ha llevado al sector agrícola a utilizar fertilizantes químicos. (Santacruz 2012). Los fertilizantes químicos están elevando cada vez más su precio, en especial los fertilizantes nitrogenados como lo son los abonos nítricos amoniacales, la urea 46 y la urea 46 cristalina (Fertiberia 2014), entre otros que contienen grandes cantidades de nitrógeno, y esto se debe a que la materia prima para la realización de estos fertilizantes es el petróleo, ya que este es un recurso no renovable su precio incrementa con forme el combustible fósil disminuye (Santacruz 2012).

En 2004 se realizó un estudio acerca de las Cianobacterias como biofertilizantes debido a la preocupación por los efectos adversos del uso indiscriminado de fertilizantes químicos en la productividad del suelo y la calidad del medio ambiente. Las cianobacterias ofrecen una alternativa económicamente atractiva y ecológicamente racional de los fertilizantes químicos para la realización del objetivo final de aumentar la productividad, sobre todo en el cultivo de arroz (Upasana; et al 2004).

En 2007 otro estudio fue realizado por estudiantes de la Universidad Nacional en la Facultad de Ciencias Agropecuarias, con el objetivo principal de evaluar la asociación entre microorganismos fijadores de nitrógeno en cultivos de arroz, en el cual se compararon entre muestras inoculadas con los microorganismos y las que no, realizando diferentes dosis de nitrógeno que permitieran analizar desde diferentes concentraciones, con eso se identificaron del genero *Azotobacter* como *A. Chroococcum*, *A. Paspali* y *A. Beijerinckii*, donde pudieron concluir que el género *Azotobacter* hace parte de la microfauna que se encuentra en el suelo. (Vallejo; et al 2007).

En 2009 estudiantes de la Pontificia Universidad Javeriana, realizo un estudio a partir de aislamiento de microorganismos fijadores de nitrógeno, en cual se trabajó específicamente con (*Azotobacter Nigricans*), para la producción de biofertilizantes en el contexto de agricultura orgánica. Este proceso fue estrictamente registrado bajo un intervalo de tiempo y determinados periodos, con lo cual concluyo determinando resultados favorables en los cultivos de *S. rebaudiana* donde fue inoculado dicho biofertilizante (Borda-Molina 2009).

Otro estudio en 2010 fue realizado para determinar el efecto que producen los plaguicidas respecto al crecimiento de *Azotobacter Chroococcum*, donde para ello se utilizó el microorganismo diazotroficador no simbiótico, en concentraciones mínimas, los resultados que arrojaron estos estudios indicaron que el microorganismo forma cierta resistencia, sin afectar su crecimiento en hábitat donde encontramos niveles elevados de plaguicidas, producto de la sobredosis suministradas normalmente en el campo. (Rivera, Camelo, Estrada, Obando y Bonilla 2010)

III MARCO LEGAL

A continuación se presenta la correspondiente legislación vigente respecto a la biorremediación de suelos en Colombia. (Ver tabla 1)

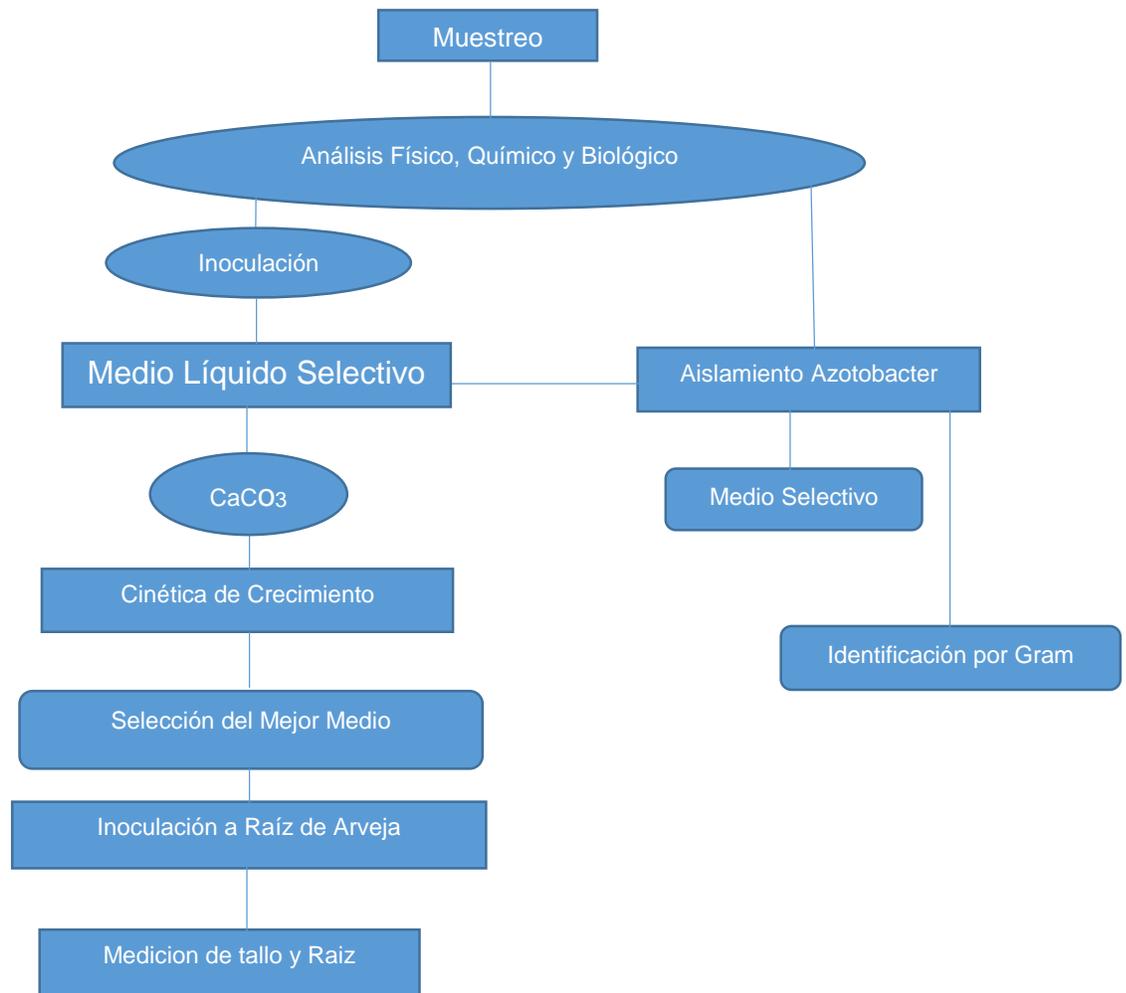
ACTO ADMINISTRATIVO	OBJETO	AÑO
Ley 99	Se crea el Ministerio de Medio Ambiente, se reordena el Sector Público encargado de la gestión y conservación del medio ambiente y recursos naturales.	1993
Ley 09	Se dictan medidas sanitarias	1979
Decreto 1843	Se reglamentan parcialmente los títulos III al XI de la Ley 09 de 1970, sobre uso y manejo de plaguicidas.	1991
Resolución 00150	Se adopta el reglamento técnico de fertilizantes y acondicionadores de suelos.	2003
Resolución 0187	Se adopta el reglamento para la producción primaria, comercialización y se establece el sistema de control de productos agropecuarios.	2006
Resolución 1023	Se dictan disposiciones sobre la distribución, comercialización y venta de insumos, material genético animal y semillas para la siembra.	1997
Resolución 1068	Se adopta el manual técnico en materia de aplicación de insumos agrícolas	1996
Resolución 0170	Se declara en Colombia el año 2009 como año de los suelos y el 17 de junio como día nacional de los suelos y se adoptan medidas para la conservación y protección de los suelos en el territorio nacional.	2009
Resolución 00544	Establece el reglamento para la producción y comercialización de productos ecológicos.	1995
Resolución 698	Establece los requisitos para el registro de departamentos, productores e importadores de bioinsumos.	2011
Resolución 3079	Dicta disposiciones sobre la industria, comercio y aplicación de bioinsumos y productos fertilizantes, acondicionadores del suelo.	1995
Resolución 000187	Adopta el reglamento para la producción primaria, procesamiento, y se establece el sistema de control de productos agropecuarios.	2006
Conpes 3577	Política nacional para la racionalización del componente de costos de producción asociado a los fertilizantes en el sector agropecuario.	2009

Tabla N°1. Legislación colombiana respecto a biofertilizantes

El acto legal en los suelos de Colombia se puede establecer que las normas que lo rigen no son muy específicas y son escasas reduciendo la gestión y conservación del suelo, especialmente en el sector agrícola. Debido a la baja regulación legislativa provoca erosión en el suelo y baja productividad en el futuro.

IV MARCO METODOLOGICO

A continuación presentamos una breve descripción detallada de lo que se trabajó durante la realización del proyecto.



IV.I DISEÑO METODOLOGICO

El trabajo de investigación se ejecutó en tres fases. En la primera fase descriptiva, se realizó el aislamiento e identificación de *Azotobacter sp.* En la segunda fase se determinó el efecto

de la inoculación de cepas nativas a caldo líquido para estimular su crecimiento y en la tercera fase un análisis de crecimiento del medio en tallo raíz.

IV.1.1 Localización

Durante los meses de Febrero a Abril de 2015 se recolectaron 6 kilos de muestra de suelo rizosférico de cultivos de arveja (*Pisum sativum*) en campos agrícolas de la vereda La Aguadita Cundinamarca. Norte 04°36'01,7" W0.74°10'56,7" a una altura de 1754 msnm. El sector presenta un clima subtropical, con una temperatura media de 20°C. Las muestras se transportaron para su procesamiento en el laboratorio de Microbiología de la Facultad de Ingeniería Ambiental, Universidad ECCI Se realizó de acuerdo al método en Zigzag (Coraspe, et al; 1996). Se procedió a tomar el área donde se hallaba mayor número de germinaciones del cultivo de arveja (*Pisum sativum*), el cual se marcó tomando 1 metro de distancia entre punto y punto seleccionado (Fuente: Autores).

Se disgregó el suelo separándolo de raíces y materia orgánica para luego ser tamizado y ser depositado en cajas de Petri en medio Azotobacter y medio ASHBY, permitiendo el crecimiento de colonias. (Ver Imagen N°1, N°2)



Imagen N°1 U. Sergio Arboleda: Disgregación y tamizado.



Imagen N°2. U. Sergio Arboleda: Disgregación y tamizado.

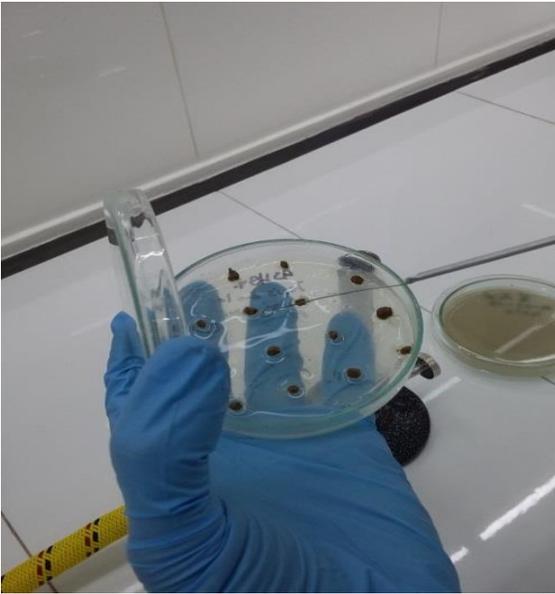


Imagen N° 3 Aislamiento de *Azotobacter sp.*

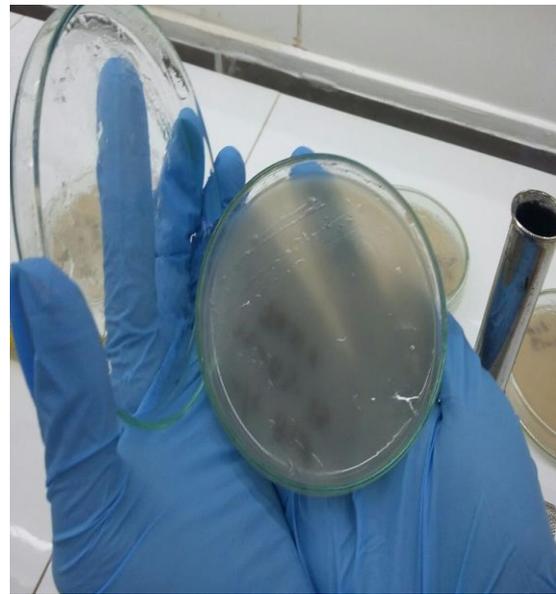


Imagen N° 4. Aislamiento de *Azotobacter sp.*

Para la determinación de los datos se utilizó el modelo de Monod, el cual consiste en evaluar el crecimiento en número de células o aumento de masa microbiana, dicho crecimiento es un factor importante de la función microbiana, dado que la especie se mantiene como resultado del incremento continuo de la población celular. (Nolasco, 2015) La primera fase donde no hay crecimiento microbiano, pero si se detecta un metabolismo activo, los microorganismos se adaptan al medio de cultivo y extraen los nutrientes necesarios. Durante la segunda etapa, se observa una duplicación celular de manera acelerada, el incrementando rápidamente las colonias de microorganismo. (Nolasco, 2015)

Se reconoció el crecimiento de los microorganismos (*Azotobacter sp.*) en los tres caldos enriquecidos y el medio control ASHBY, en los cuales se determinó la biomasa celular y velocidad de crecimiento, mediante el uso del espectrofotómetro de luz visible, y simultáneamente los Erlenmeyer permanecieron en un shaker, tomando muestras con intervalos de tiempo de dos horas por día, durante tres semanas consecutivas. (Ver imagen N° 5 y N° 6)



Imagen N° 5 Evaluación de crecimiento espectrofotómetro

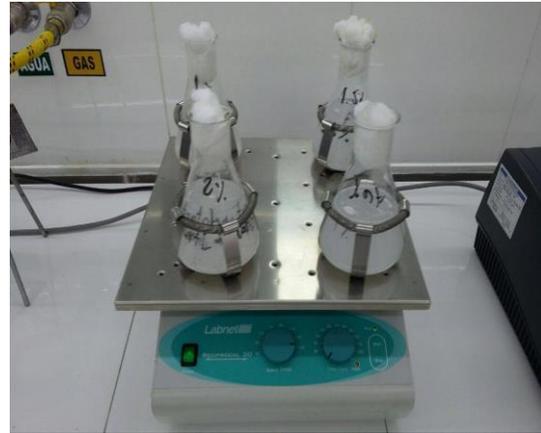


Imagen N° 6: Evaluación de crecimiento shaker

Según el método de Monod (Nolasco 2015), se divide en partes, en este caso la primera fase de adaptación del microorganismo demora 2 días, en los cuales no se evidencia mayor crecimiento comparado con el resto de los días calculados. Para la segunda fase se observa un mayor crecimiento. Respecto a los datos arrojados en la verificación de crecimiento celular, se puede evidenciar que la mayor masa microbiana se presentó en el Erlenmeyer con la concentración de CaCO_3 al 1%, y consecutivo el Erlenmeyer control que no poseía ninguna concentración de (CaCO_3). Para apreciar mejor la cinética de crecimiento, se realizó una gráfica líneas a continuación.

Respecto al medio selectivo ASHBY, se incorporaron diferentes concentraciones de CaCO_3 , durante el periodo de tiempo en el cual los Erlenmeyer estuvieron en el Shaker se evidenció turbiedad en el caldo selectivo. Se identificaron las colonias de *Azotobacter sp.* Por medio de tinción de Gram, la cual arrojó resultados positivos en cuanto al incremento de las colonias en las tres concentraciones de CaCO_3 y en el control.

Respecto a la selección del medio, se realizó teniendo en cuenta cual medio brindaba las mejores opciones de nutrientes para el óptimo desarrollo y crecimiento de *Azotobacter sp.* El medio ASHBY contiene fuentes de nitrógeno insignificantes, lo cual le permite al microorganismo sintetizar y aumentar las cantidades de nitrógeno de manera ordenada. El medio permitió adicionar las diferentes concentraciones de CaCO_3 , sin que sus compuestos chocaran entre sí.

Se realizó una mezcla de suelo y humus de lombriz en 4 diferentes porcentajes de cantidad (Ver tabla N°2): 50% suelo 50% Humus (1:1). 70% suelo 30% Humus (2:1). 80% suelo 20% Humus (3:1) y uno con contenido de suelo únicamente (Ver tabla N° 2). Separamos una pequeña cantidad en bancos de semillas. Sembrando arveja chilena e inoculando el caldo selectivo de *Azotobacter sp.*, en cada banco con la semilla y evaluando su crecimiento de tallo y raíz (Fuente: Autores).

CONCENTRACION CaCO ₃	EQUIVAENCIA ENTRE HUMUS:SUELO	PESO EN GRAMOS DE LAS PROPORCIONES (g)
Control (sin CaCO ₃)	1:1	S. 63,7; H 63,7
1% CaCO ₃	3:1	S.101,9; H 25,4
1.5% CaCO ₃	Control (sin humus)	S. 127,4
2.0% CaCO ₃	2:1	S. 89,1; H 38,2

Tabla N°2. Tabla de relaciones entre CaCO₃ y humus: suelo

Para su etapa de irrigación se realizó día intermedio, proporcionando la cantidad de agua suficiente para el óptimo crecimiento de la planta de arveja (*Pisum sativum*), durante este proceso se llevó a cabo un control de crecimiento midiendo raíz y tallo. (Ver imagen N°7)



Imagen N°7. Banco de semillas y cinética de crecimiento.

Nuevamente se realizó un control cada tres días, en donde se midió el crecimiento de las plantas de arveja (*Pisum sativum*), en cuanto a tallo y raíz, comparado con el medio control. Durante las semanas de crecimiento y la medición del tallo logramos concluir que el semillero que contenía la combinación de 50% suelo y 50% humus fue el que presentó mayor crecimiento. El humus de lombriz mejora las propiedades físicas del suelo, como la capacidad de intercambio catiónico, retiene la humedad y beneficia la permeabilidad. El tallo más largo fue de 71.8 cm de largo en un tiempo de dos semanas y medio. (Fuente: Autores)

V RESULTADOS Y ANALISIS

V.I AISLAMIENTO AZOTOBACTER

Se preparó un medio selectivo gelificado de ASHBY y Azotobacter, con el objetivo de facilitar nutricionalmente el crecimiento de *Azotobacter sp.*, este procedimiento duro alrededor de seis semanas, en las cuales se obtuvieron 10 cepas para crecimiento de *Azotobacter sp.*, seis cepas contenían el medio selectivo Azotobacter y las cuatro restantes contenían el medio ASHBY.

Como resultado de este procedimiento, dos cepas que contenían el medio ASHBY (Ver imagen N°11 y N° 12) y una cepa que contenía el medio Azotobacter se contaminaron con hongo, de las dos cepas restantes que contenían el medio ASHBY no se observó un crecimiento significativo de agente fijador de nitrógeno *Azotobacter sp.*

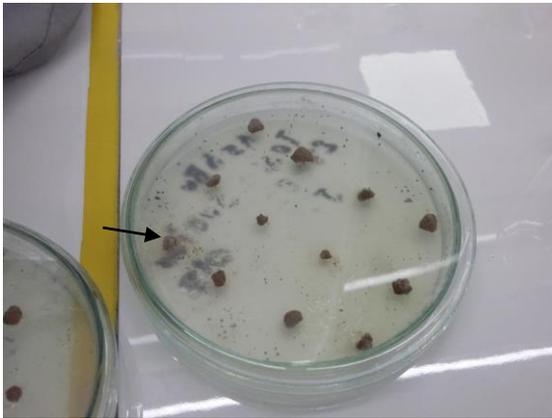


Imagen N°8 Cepa con medio ASHBY, donde se señala el crecimiento de hongo)

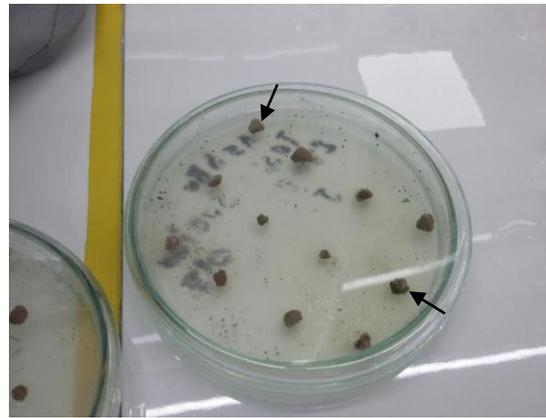


Imagen N°9 Cepa con medio ASHBY, donde se el crecimiento de hongo)

Se procedió a realizar identificación mediante tinción de Gram a las cepas en las cuales se evidenció crecimiento de colonias de *Azotobacter sp.* Al observar en el microscopio se corroboró el crecimiento de dichas colonias (ver imagen N°13 y N°14.)



Imagen N°10 Tinción de Gram de la cepa numero 3 Colonias de *Azotobacter sp*



Imagen N° 11. Tinción de Gram de la cepa numero 5 Colonias de *Azotobacter sp.*

V.II IDENTIFICACIÓN MACROSCOPICA

La identificación macroscópica se aplicó a las seis cepas que contenían el medio selectivo Azotobacter, debido a que en este medio se identificó mayor crecimiento y desarrollo de biopelículas sobre gránulos de suelo inoculados en las cepas de mayor crecimiento, (ver tabla 3.)

Las biopelículas consisten en células microbianas impregnadas en la matriz de las secreciones extracelulares poliméricas y se adhieren a las superficies, (Betancourth; et al 2004), las cuales se producen por el aumento significativo de microorganismos, y estos se van agrupando en colonias con diferentes requerimientos metabólicos, (American Society of Microbiology, 2004). (Ver imagen N° 12.)

IDENTIFICACION MACROSCOPICA	CEPA 1	CEPA 2	CEPA 3	CEPA 4	CEPA 5	CEPA 6
Formas de las colonias	Pequeña e irregular					
Color	Blanco grisáceo	Gris	Blanco grisáceo	Blanco grisáceo	Gris	Blanco grisáceo
Exopolímero	60%	50%	30%	80%	30%	20%
Olor	Sin olor					

Tabla N° 3. Identificación macroscópica de seis cepas en las que se agregó el medio selectivo Azotobacter y en estas se evidencio mayor crecimiento de colonias de *Azotobacter sp.*

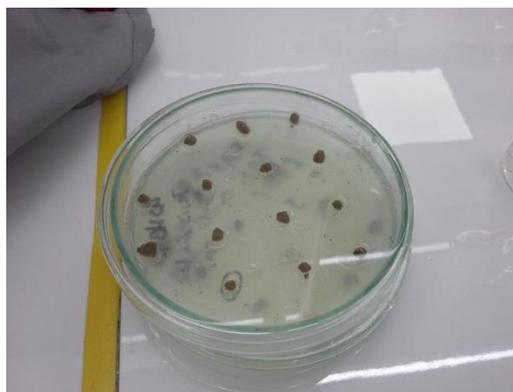


Imagen N° 12. Cepa N° 2 de medio Azotobacter con exopolímeros

V.III IDENTIFICACION MICROSCOPICA

En la siguiente tabla se presentan los resultados de los análisis microscópicos realizados a las cepas en donde se evidencio un crecimiento significativo de *Azotobacter sp.* (Ver tabla N° 4.)

Las bacterias Gram negativas utilizan la ruta de Entner-Doudoroff la cual consiste en metabolizar alternativamente la glucosa, estas se caracterizan por tener una pared celular más compleja con una bicapa lipida externa, espacio periplasmático, aerobios o anaerobios y poseen en altas concentraciones. (Asca; et al; 2010)

CEPAS EVALUADAS	BACILOS	GRAM POSITIVO	GRAM NEGATIVO
CEPAS DE LA 1 A LA 6	++	-	++
CON MEDIO SELECTIVO			
AZOTOBACTER	++	-	++

Tabla N° 4. Resultados microscópicos. Resultados (++) positivo y (-) negativo

VI DETERMINACIÓN DE PARÁMETROS FISICOQUÍMICOS

VI.I Textura

Este análisis se realizó evaluando los siguientes aspectos; pH el cual se determinó con el método potenciométrico (Willard, et al; 1974), para la evaluación de este parámetro se pesaron 30 mg de muestra de suelo a los cuales se le agregaron 60 ml de agua destilada, mezclados en un vaso precipitado de 100 ml, formando una pasta homogénea, se introduce el electrodo del potenciómetro y este arroja el resultado de pH directamente. (Calderón, et al; 1999). (Ver imagen N° 13)



Imagen N° 13. Mezcla para determinar composiciones del suelo y Figura 16 pH midiendo la acides del suelo.

El siguiente parámetro evaluado es la textura de la muestra, para el cual se utilizó el método de los tamices, que se extrae de la primera etapa del (Método de la Pipeta), consiste en pasar las muestras por tamices de luz decreciente, (Comerma 1984).

Según el sistema internacional en su clasificación mediante la curva granulométrica el suelo es arcilloso si es menor a 0,002 mm la dimensión de la partícula elemental. Al igual que la USDA Departamento de agricultura de los Estados Unidos mientras que para la Unión Soviética el suelo es arcilloso si la dimensión de la partícula es menor a 0,001 mm. Concluyendo que el suelo de la vereda la Aguadita es arcilloso según el sistema internacional y para la USDA, mientras que para la Unión Soviética es limo fino. (Ver imagen N° 9 y N° 10)

Según la tabla de colores Munsell, el suelo trabajado está clasificado en la tabla 10YR un valor de 7/4 en el tamiz más fino y húmedo dio un valor de 8/4. (Ver imagen N°14 y 15)

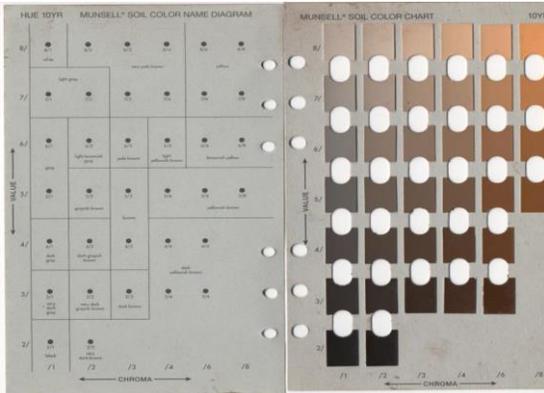


Imagen N°14 Carta de colores Munsell tabla 10YR



Imagen N°15 Suelo granulado, vereda la Aguadita

Según el sistema internacional en su clasificación según la curva granulométrica el suelo es arcilloso si es menor a 0,002 mm la dimensión de la partícula elemental. Al igual que la USDA Departamento de agricultura de los Estados Unidos mientras que para la Unión Soviética el suelo es arcilloso si la dimensión de la partícula es menor a 0,001 mm. Concluyendo que el suelo de la vereda la Aguadita es arcilloso según el sistema internacional y para la USDA, mientras que para la Unión Soviética es limo fino.

VI.II Color

Para la determinación del estado del color en la muestra comparado con la carta de colores Munsell, se tomó una muestra del tamiz de menor longitud repasándola en una hoja blanca e hicimos el procedimiento con la muestra en seco y húmedo. Encontramos que la muestra en seco es 10YR 8/4 y en estado húmedo es de 10YR 7/4. Según el modelo de Munsell está presentado el YR como un color naranja (Munsell). Los suelos de climas templados y frescos húmedos a subhúmedos como la vereda presentan una composición de a-FeO (OH) cristalino con reacciones ligeramente ácidas.

Los suelos han evolucionado a partir de arcillas presentando pocos cantos semiangulosos de lutitas y areniscas en la superficie y a través del perfil. Químicamente son de reacción muy ácida a casi neutra, pobres a muy pobres en bases de cambio, nitrógeno, fósforo y potasio y con contenidos medios de aluminio intercambiable.

A continuación se presenta una tabla con los parámetros físicos determinados en el laboratorio de suelos de la Universidad Sergio Arboleda. Tabla de parámetros físicos. (Ver tabla N° 5)

PARAMETROS FISICOS	RESULTADOS
COLOR	Muestra en seco: 10 YR 8/4 Muestra húmeda: 10 YR 7/4
pH	Primera muestra: 5.3 Segunda muestra: 4.9
TEXTURA	Franco - arcilloso

Tabla N° 5. Resultados de los parámetros físicos determinad

VI.III PH

Con el procedimiento respectivamente mencionado, en la primera lectura de pH la primera muestra dio un porcentaje de 5.3 y en la segunda muestra 4.9 el pH

El Departamento de agricultura de los Estados Unidos clasifica los rangos de pH del suelo como ácido muy fuerte a los rangos 4.5 – 5.0 y ácido fuerte a los rangos 5.1 - 5.5 concluyendo que para la muestra 1 presenta suelos ácido fuerte y para la segunda muestra, ácido muy fuerte. Los criterios de evaluación del pH de un suelo según la norma (nom-021-recnat-2000), demuestra que los suelos de las dos muestras son moderadamente ácidos.

VI.IV NITROGENO

El resultado de Nitrógeno arrojado en los análisis químicos indica que las muestras de suelo objeto de análisis contienen un bajo porcentaje de este elemento.

Cuando el nivel de Nitrógeno es bajo a causa de la baja síntesis de proteínas, como consecuencia de la tasa metabólica que disminuye, y la respiración se hace baja y la fotosíntesis no satisface completamente las necesidades de la planta, para finalmente dar como resultado una alta acumulación de carbohidratos solubles a escala celular. (Ecoplexity; 2009)

VI.V FOSFORO

Este compuesto débilmente soluble con cationes divalentes y monovalentes, por esta razón la calidad del fosforo en una solución suelo pequeña, las plantas toman ese componente que a su vez se encuentran en equilibrio con el fosforo de la fase sólida.

La cantidad de fosforo disponible en el suelo varia constantemente de acuerdo a las condiciones ambientales que a su vez influyen sobre el suelo y el desarrollo de las plantas. (Rojas; 2008)

En la siguiente tabla se muestran los resultados de los parámetros químicos (Nitrógeno y Fosforo), en forma de porcentajes para un posterior análisis. (Ver tabla N°10)

PARAMETROS QUIMICOS	RESULTADOS
NITROGENO	0,8%
FOSFORO	0,14%

Tabla N° 6. Análisis químicos realizados a las muestras de suelo

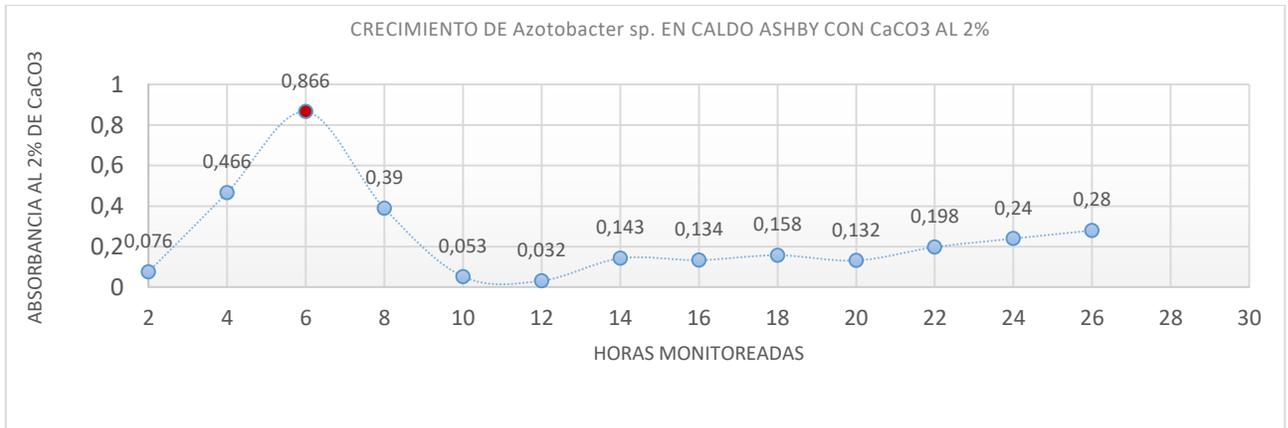
VI.VI CALDOS Y CINÉTICA DE CRECIMIENTO

Se obtuvieron cuatro caldos con el medio selectivo ASHBY, al 1%, 1.5%, 2% de CaCO_3 , y un medio control. De esto se determinó mediante un espectrofotómetro la biomasa celular, registrando los resultados de las mediciones cada dos horas por día, de este procedimiento se obtuvieron los siguientes resultados: Para la concentración del 2% de CaCO_3 . (Ver tabla N° 7.)

2% CaCO_3 (Mg/L)	HORAS DE MONIT.
0,076	2
0,466	4
0,866	6
0,39	8
0,053	10
0,032	12
0,143	14
0,134	16
0,158	18
0,132	20
0,198	22
0,24	24
0,28	26

Tabla N° 7. Toma de datos en el espec. Concentración al 2% CaCO_3

En esta tabla se recopilaron los datos registrados con un total de 26 horas en el espectrofotómetro, la concentración de CaCO_3 en el caldo selectivo ASHBY es del 2%. Para entender mejor el incremento de la masa microbiana en esta concentración, se presenta la siguiente gráfica. (Ver gráfica N°1.)



Gráfica N° 1. Crecimiento de Azotobacter sp., en caldo ASHBY con CaCO_3 al 2 %

En esta gráfica se muestra el incremento de la masa microbiana en un 24,37% del caldo con la concentración de 2% de CaCO_3 , donde el aumento más significativo estuvo marcado en la hora seis con 0,866 mg/l, esto significó un aumento del 16,6% frente al promedio total del resto de valores monitoreados. Su masa microbiana descendió en la hora diez con el menor número registrado 0,053 mg/l, para luego mantenerse estable en sus valores.

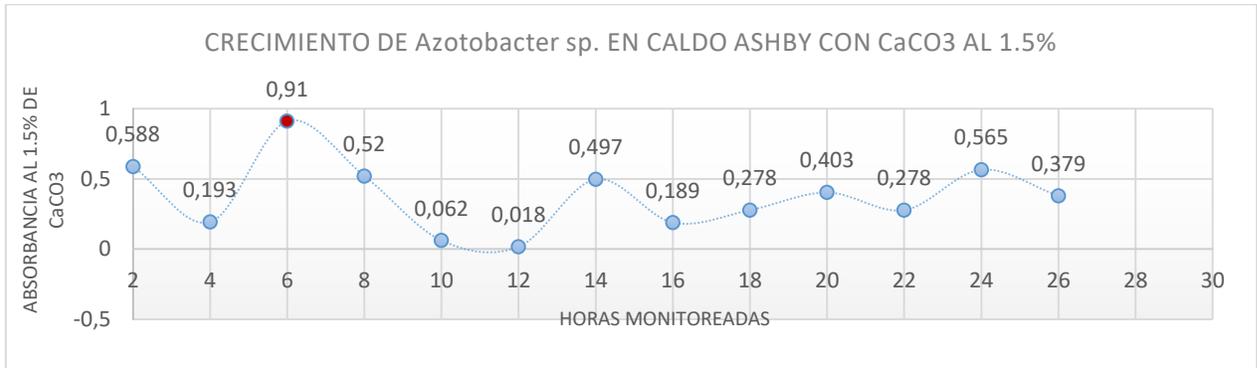
Para la concentración del 1.5% se obtuvieron los siguientes valores (Ver tabla N° 8.)

1.5% CaCO_3 (Mg/L)	HORAS DE MONIT.
0,588	2
0,193	4
0,91	6
0,520	8
0,062	10
0,018	12
0,497	14
0,189	16
0,278	18
0,403	20
0,278	22
0,565	24
0,379	26

Tabla N° 8. Toma de datos en el espec. Concentración al 1.5% CaCO_3

Tabla de los datos registrados durante las mediciones en el espectrofotómetro con el caldo selectivo ASHBY a concentración 1.5% de CaCO_3 .

En la siguiente grafica se muestra de forma más clara el comportamiento de la masa microbiana en el caldo selectivo ASHBY con una concentración de CaCO_3 al 1.5%, la cual fue monitoreada durante 26 horas, tomando muestras cada dos horas por día. (Ver grafica N°2.)



Grafica N° 2. Crecimiento de Azotobacter sp., en caldo ASHBY con CaCO_3 al 1,5 %

En esta grafica se muestra el incremento de la masa microbiana en un 37,54% del caldo con la concentración de 1,5% de CaCO_3 , donde el aumento más significativo estuvo marcado en la hora seis con un valor de 0,910 mg/l, esto significó un aumento del 30,1% frente al promedio total del resto de valores monitoreados. Su masa microbiana descendió en la hora diez con el menor valor registrado de 0,062 mg/l, aumento nuevamente en la hora catorce con un valor de 0,497 mg/l y se mantuvo estable.

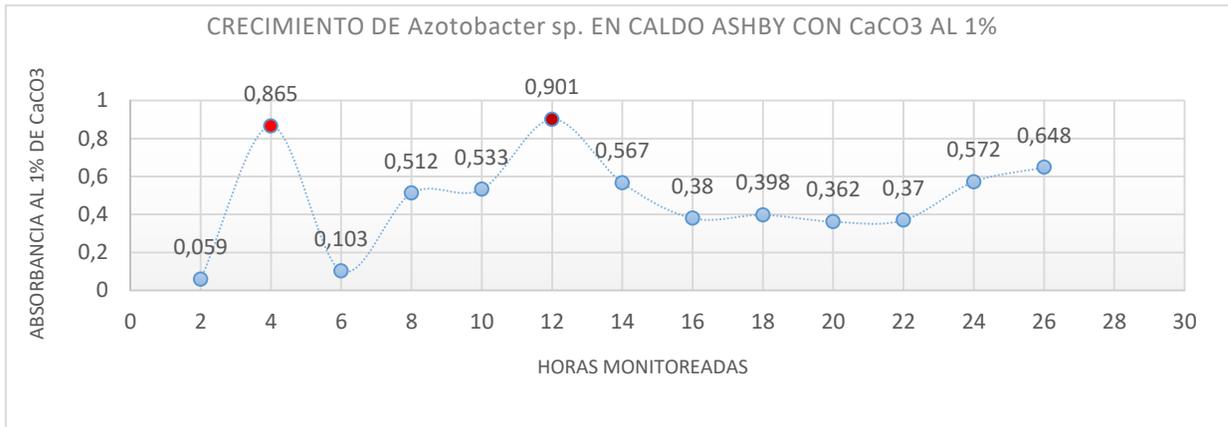
Para la concentración del 1% se obtuvieron los siguientes valores (Ver tabla N° 9.)

1% CaCO_3 (Mg/L)	HORAS DE MED.
0,059	2
0,865	4
0,103	6
0,512	8
0,533	10
0,901	12
0,567	14
0,38	16
0,398	18
0,362	20
0,37	22
0,572	24
0,648	26

Tabla N° 9. Toma de datos en el espec. Concentración al 1% CaCO_3

Tabla de los datos registrados durante las mediciones en el espectrofotómetro con el caldo selectivo ASHBY a concentración 1% de CaCO_3 .

En la siguiente grafica se muestra de forma más clara el comportamiento de la masa microbiana en el caldo selectivo ASHBY con una concentración de CaCO₃ al 1%, la cual fue monitoreada durante 26 horas, tomando muestras cada dos horas por día. (Ver gráfico N° 3)



Grafica N° 3. Crecimiento de Azotobacter sp., en caldo ASHBY con CaCO₃ al 1%

En esta grafica se muestra el incremento de la masa microbiana en un 48,23% del caldo con la concentración de 1% de CaCO₃, donde el aumento más significativo estuvo marcado en la hora doce con un valor de 0,901 mg/l, esto significó un aumento del 43,46% seguido por otro aumento significativo en la hora cuatro con un valor de 0,865 mg/l, lo cual significó un incremento del 41,72% frente al promedio total de valores monitoreados. Su masa microbiana se disminuyó en la hora dos con el menor valor registrado de 0,059 mg/l.

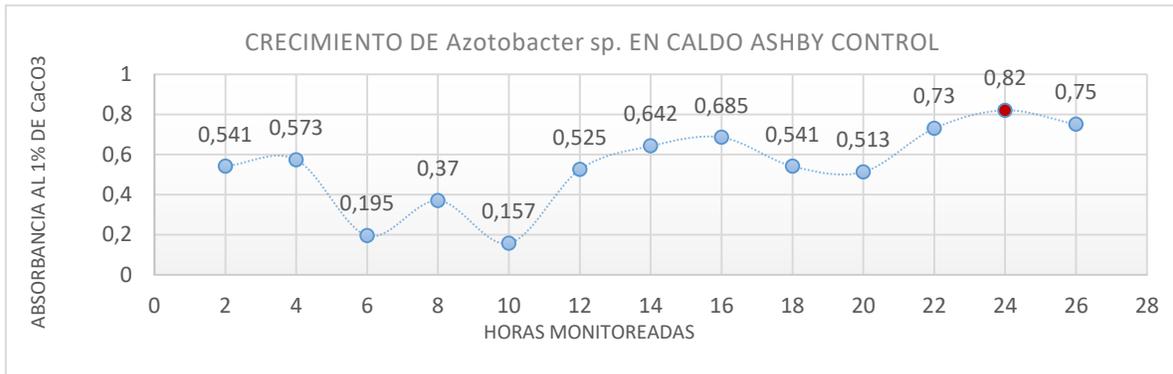
Para el control se obtuvieron los siguientes valores (Ver tabla N° 10.)

CTRL Mg/L	HORAS DE MED.
0,541	2
0,573	4
0,195	6
0,37	8
0,157	10
0,525	12
0,642	14
0,685	16
0,541	18
0,513	20
0,73	22
0,82	24
0,75	26

Tabla N° 10. Toma de datos en el espec. Ctrl.

Tabla de los datos registrados durante las mediciones en el espectrofotómetro con el caldo selectivo ASHBY medio Ctrl.

En la siguiente grafica se muestra de forma más clara el comportamiento de la masa microbiana en el caldo selectivo ASHBY medio Ctrl, la cual fue monitoreada durante 26 horas, tomando muestras cada dos horas por día. (Ver gráfico N° 4.)



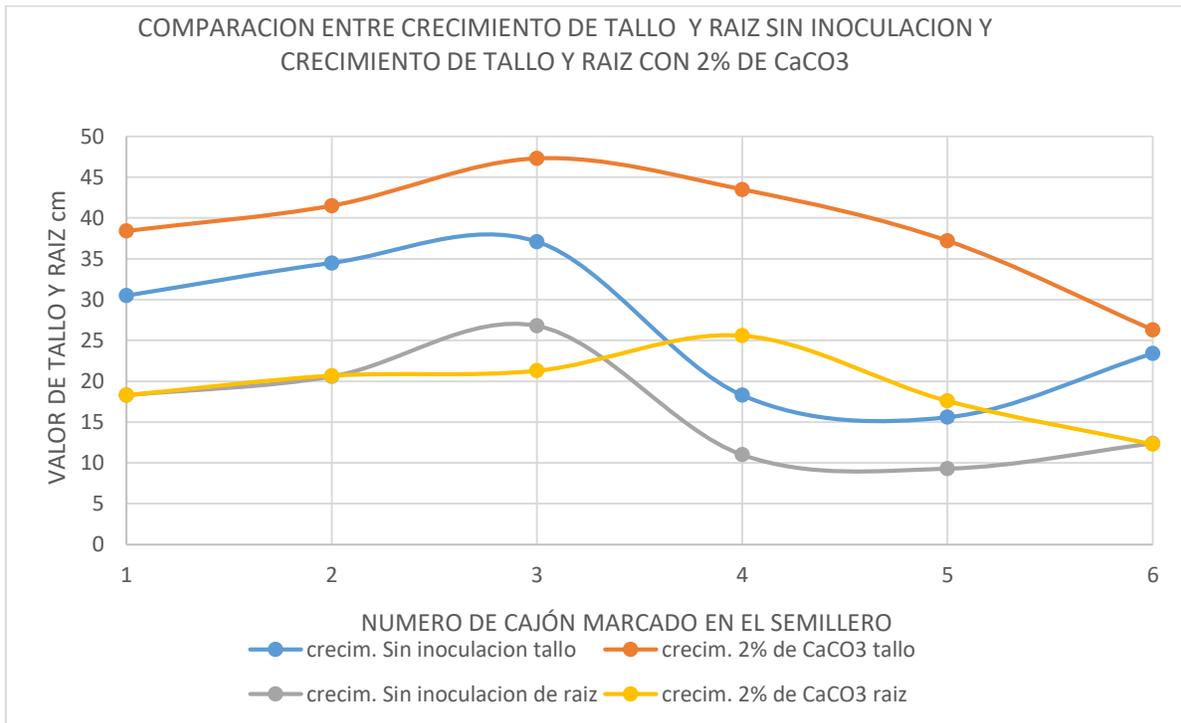
Grafica N° 4. Crecimiento de *Azotobacter sp.*, en caldo ASHBY Control

En esta grafica se muestra el incremento de la masa microbiana en un 54,17% del caldo Control, donde el aumento más significativo estuvo marcado en la hora veinticuatro con un valor de 0,82 mg/l, esto significó un aumento del 44,42% frente al promedio total del resto de valores monitoreados. Su masa microbiana descendió en la hora diez con el menor valor registrado de 0,195 mg/l, aumento nuevamente en la hora catorce con un valor de 0,525 mg/l y se mantuvo en aumento. Este caldo Control, presento el mayor crecimiento de la masa microbiana entre todas las muestras monitoreadas, puesto que no se agregó ningún tipo concentración de CaCO₃ para permitir dicho crecimiento de *Azotobacter sp.*

VII CRECIMIENTO EN BANCO DE SEMILLAS

A continuación se presentan una serie de graficas con el objetivo de comparar y analizar la curva de crecimiento de raíz y tallo de seis cajones en los cuales no fue inoculado ningún tipo de componentes y los cajones en los cuales se inoculo CaCO₃ en diferentes concentraciones (2%, 1,5%, 1% y Ctrl).

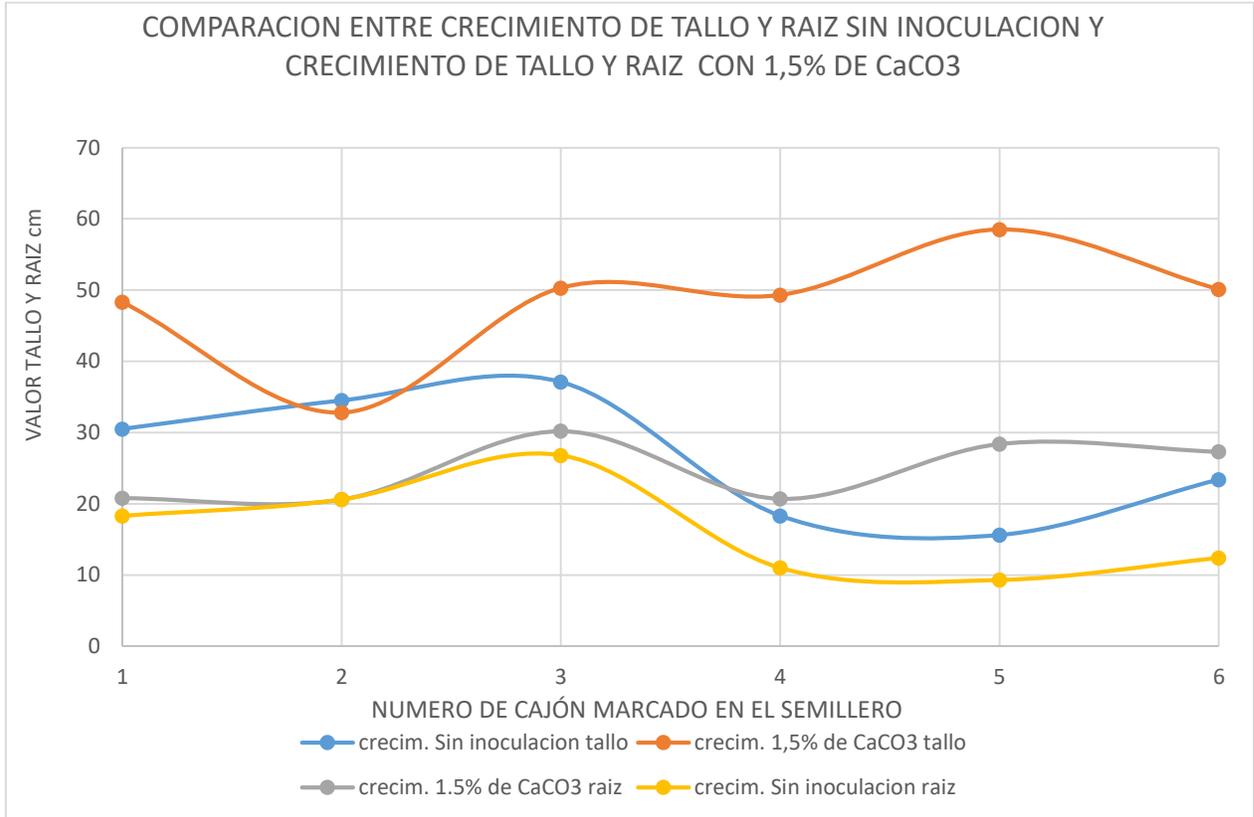
Tabla de registros de medición en tallo y raíz con inoculación de caldo selectivo de 2% CaCO₃. (Ver grafica N° 5)



Grafica N° 5. Registros de medición de tallo y raíz de 2% de CaCO₃ y en contraste las mediciones sin inoculación de ninguna sustancia

El incremento en el tallo fue del 39,03 % en comparación con la medición de referencia en la cual se obtuvo un valor de 26,57% en tallo, el aumento en comparación con el valor referencia es del 12,47%. Con respecto a la raíz su porcentaje en los registros de CaCO₃ al 2% fue de 19,3% en comparación con el valor de referencia de la raíz que es de 16,04%, su aumento en comparación con el valor de referencia fue del 2,9%.

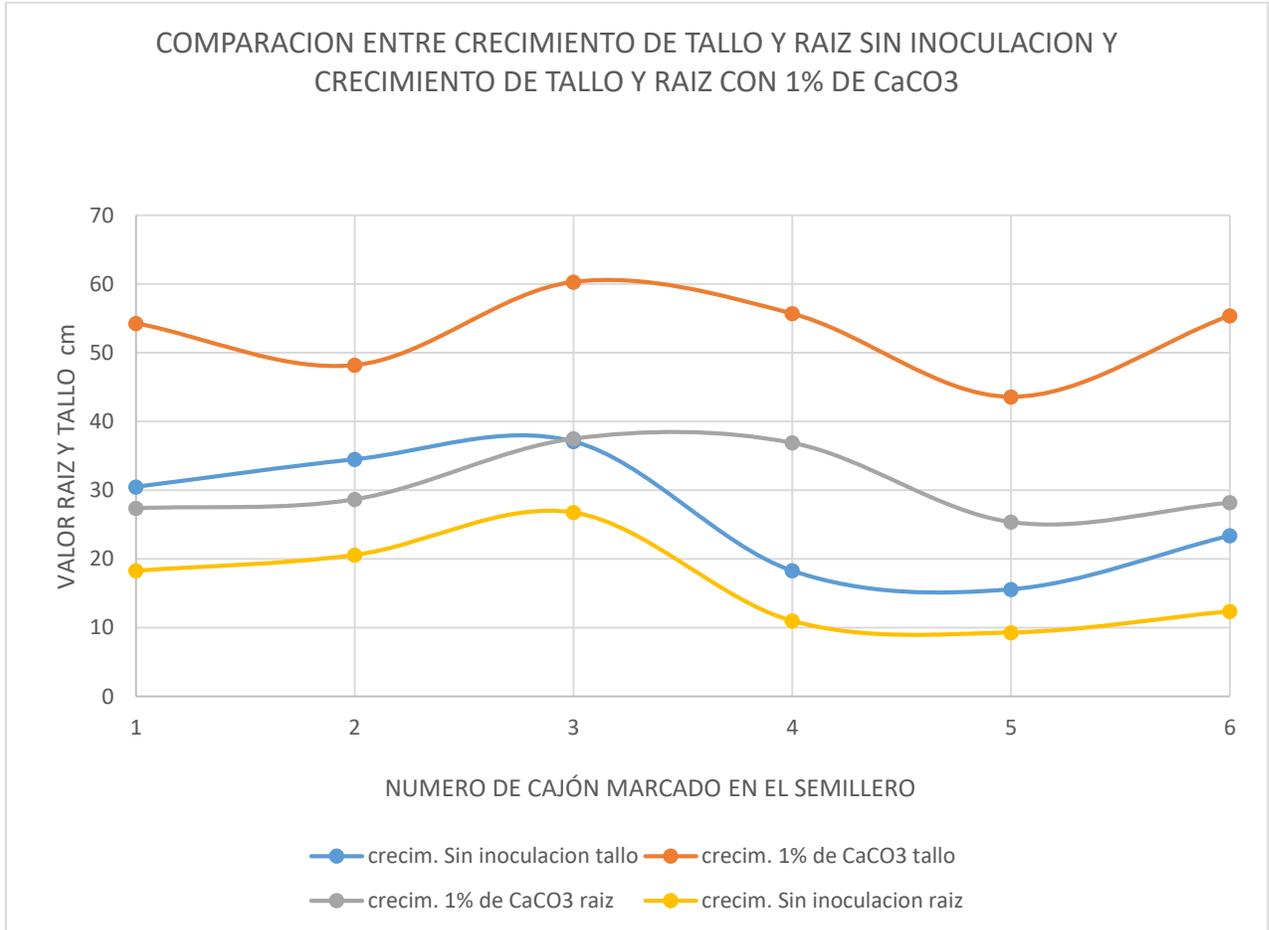
Tabla de registros de medición en tallo y raíz con inoculación de caldo selectivo de 1,5% CaCO₃. (Ver grafica N° 6)



Grafica N° 6. Registros de medición de tallo y raíz de 1,5% de CaCO₃ y en contraste las mediciones sin inoculación de ninguna sustancia

El incremento en el tallo fue del 50,25% en comparación con la medición de referencia en la cual se obtuvo un valor de 26,57% en tallo, el aumento en comparación con el valor referencia es del 23,68%. Con respecto a la raíz su porcentaje en los registros de CaCO₃ al 1,5% fue de 24,67% en comparación con el valor de referencia de la raíz que es de 16,04%, su aumento en comparación con el valor de referencia fue del 8,27%.

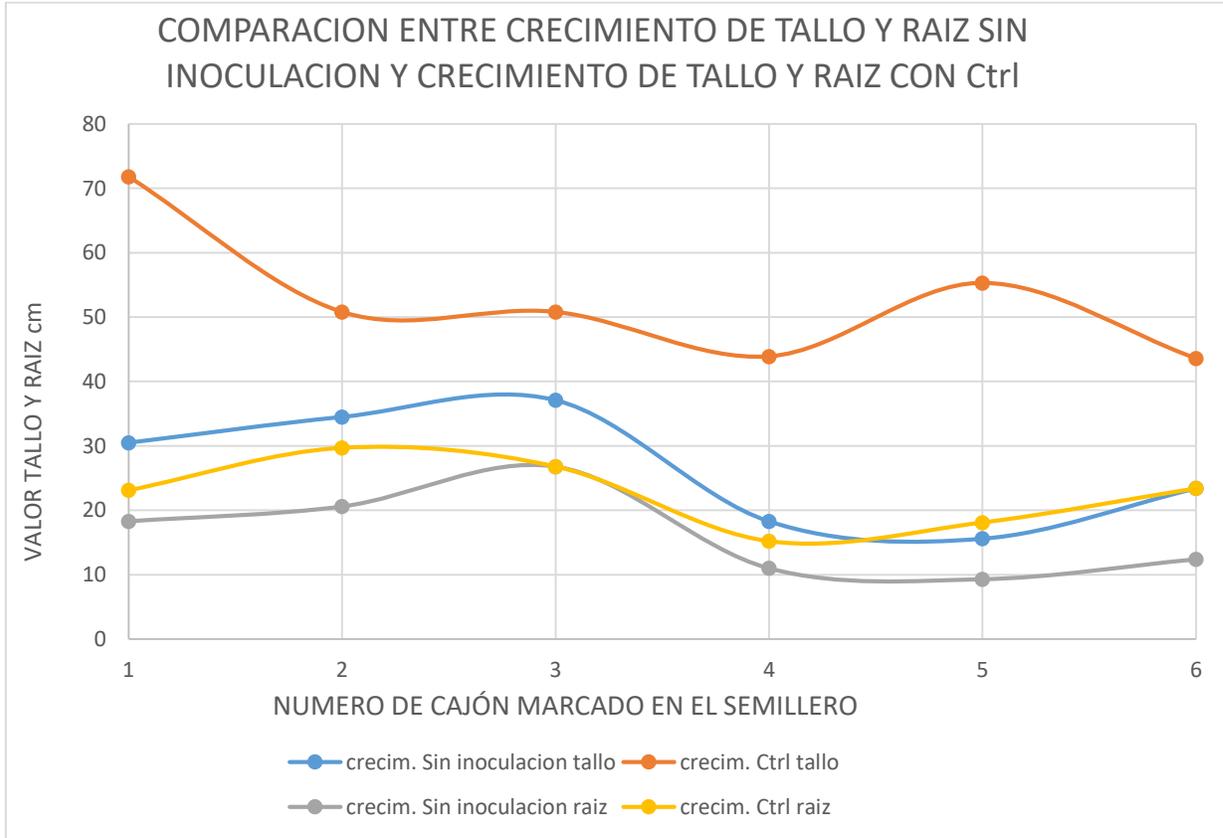
Tabla de registros de medición en tallo y raíz con inoculación de caldo selectivo de 1% CaCO₃. (Ver grafica N° 7)



Grafica N° 7. Registros de medición de tallo y raíz de 1% de CaCO₃ y en contraste las mediciones sin inoculación de ninguna sustancia

El incremento en el tallo fue del 52% en comparación con la medición de referencia en la cual se obtuvo un valor de 26,57% en tallo, el aumento en comparación con el valor referencia es del 26,35% casi el doble en comparación con el valor de referencia. Con respecto a la raíz su porcentaje en los registros de CaCO₃ al 1% fue de 30,68% en comparación con el valor de referencia de la raíz que es de 16,04%, su aumento en comparación con el valor de referencia fue del 14,28%.

Tabla de registros de medición en tallo y raíz con inoculación de caldo selectivo Ctrl. (Ver grafica N° 8)



Grafica N° 8. Registros de medición de tallo y raíz del caldo selectivo Ctrl y en contraste las mediciones sin inoculación de ninguna sustancia

El incremento en el tallo fue del 52,7% en comparación con la medición de referencia en la cual se obtuvo un valor de 26,57% en tallo, el aumento en comparación con el valor referencia es del 26,13% casi el doble en comparación con el valor de referencia. Con respecto a la raíz su porcentaje en los registros del caldo selectivo Ctrl fue de 36,17% en comparación con el valor de referencia de la raíz que es de 16,04%, su aumento en comparación con el valor de referencia fue del 19,77%.

VIII CONCLUSIONES

El mayor cubrimiento de biopelículas y crecimiento de colonias de *Azotobacter* sp., se dio en las cepas 3 y 5, en las cuales el medio sólido fue *Azotobacter*, lo que demostró que este medio fue el óptimo para el crecimiento y desarrollo de dicho microorganismo.

En el medio líquido con diferentes concentraciones de CaCO_3 , se logró identificar mayor crecimiento de la masa microbiana en las muestras que contenían CaCO_3 a concentración del 1% y la muestra control, la cual no contenía ninguna concentración de CaCO_3 , esto demuestra que esta concentración es idónea para que se dé un desarrollo óptimo de colonias *Azotobacter* sp.

El medio líquido donde se observó menor crecimiento de colonias *Azotobacter* sp., fue en la muestra que contenía la mayor concentración de CaCO_3 al 2%, y posteriormente tuvo incidencia en el crecimiento poco productivo de las semillas a las que se les inoculó el medio.

El incremento en tallo y raíz de las semillas de (*Pisum sativum*) inoculadas con los medios líquidos, obtuvieron una gran diferencia en porcentaje respecto a las semillas control, las cuales no fueron inoculadas con un medio líquido de *Azotobacter* sp., el mayor aumento adquirido con las semillas inoculadas fue del 52,7% el cual se dio en el medio líquido control (sin concentración de CaCO_3).

IX LISTA DE TABLAS

Tabla N°1. Legislación colombiana respecto a biofertilizantes.

Tabla N°2. Tabla de relaciones entre CaCO₃ y humus: suelo

Tabla N° 3. Identificación macroscópica de seis cepas en las que se agregó el medio selectivo *Azotobacter* y en estas se evidencio mayor crecimiento de colonias de *Azotobacter sp.*

Tabla N° 4. Resultados microscópicos. Resultados (++) positivo y (-) negativo

Tabla N° 5. Resultados de los parámetros físicos determinados

Tabla N° 6. Análisis químicos realizados a las muestras de suelo

Tabla N° 7. Toma de datos en el espec. Concentración al 2% CaCO₃

Tabla N° 8. Toma de datos en el espec. Concentración al 1.5% CaCO₃

Tabla N° 9. Toma de datos en el espec. Concentración al 1% CaCO₃

Tabla N° 10. Toma de datos en el espec. Ctrl.

X LISTA DE IMAGENES

Imagen N°1 y N° 2. Universidad Sergio Arboleda: Disgregación y tamizado.

Imagen N° 3 y N° 4. Aislamiento de *Azotobacter sp* del suelo y llevado a un nuevo medio selectivo

Imagen N° 5 y N° 6: Evaluación de crecimiento utilizando los equipos espectrofotómetro

Imagen N°7. Banco de semillas y cinética de crecimiento.

Imagen N°10 Tinción de Gram de la cepa numero 3 Colonias de *Azotobacter sp*

Imagen N° 11. Tinción de Gram de la cepa numero 5 Colonias de *Azotobacter sp.*

Imagen N° 12. Cepa N° 2 de medio *Azotobacter* con exopolímeros

Imagen N° 13. Mezcla para determinar composiciones del suelo y Figura 16 pH midiendo la acides del suelo.

Imagen N° 14 Carta de colores Munsell tabla 10YR

Imagen N° 15 Suelo granulado, vereda la Aguadita

X LISTA DE GRAFICAS

Grafica N° 1. Crecimiento de Azotobacter sp., en caldo ASHBY con CaCO₃ al 2 %

Grafica N° 2. Crecimiento de Azotobacter sp., en caldo ASHBY con CaCO₃ al 1,5 %

Grafica N° 3. Crecimiento de Azotobacter sp., en caldo ASHBY con CaCO₃ al 1%

Grafica N° 4. Crecimiento de Azotobacter sp., en caldo ASHBY Control

Grafica N° 5. Registros de medición de tallo y raíz de 2% de CaCO₃ y en contraste las mediciones sin inoculación de ninguna sustancia

Grafica N° 6. Registros de medición de tallo y raíz de 1,5% de CaCO₃ y en contraste las mediciones sin inoculación de ninguna sustancia

Grafica N° 7. Registros de medición de tallo y raíz de 1% de CaCO₃ y en contraste las mediciones sin inoculación de ninguna sustancia

Grafica N° 8. Registros de medición de tallo y raíz del caldo selectivo Ctrl y en contraste las mediciones sin inoculación de ninguna sustancia

BIBLIOGRAFÍA

- A., j. (2009). *Handbook of Industrial Chemistry and Biotechnology*. Obtenido de <http://www.springer.com/us/book/9781461442585>
- agricola, r. (2013). *Novedades en Fertilizantes Nitrogenados*. Obtenido de <http://www.redagricola.com/reportajes/nutricion/novedades-en-fertilizantes-nitrogenados>
- agricola, r. (2013). *Novedades en Fertilizantes Nitrogenados*. Obtenido de <http://www.redagricola.com/reportajes/nutricion/novedades-en-fertilizantes-nitrogenados>
- aleco. (2009). *fertilizantes biológicos*. Obtenido de nutrición vegetal: <http://www.alecoconsult.com/fertilizantes/info-nutricion-vegetal.html>
- ambientum, r. (2000). *Acción de los fertilizantes en los suelos*. Obtenido de <http://www.estrucplan.com.ar/articulos/verarticulo.asp?IDArticulo=423>
- Ardila, L. 2. (s.f.). *Fijación de Nitrógeno atmosférico. Agricultura Sensitiva*. Obtenido de http://www.agriculturasensitiva.com/n_atmosferico.htm.
- avella, d. j. (AGOSTO de 2007). *caracterización molecular de cepas nativas colombianas de Azotobacter spp. mediante el análisis de restricción del DNA Ribosomal 16S*. Obtenido de <http://javeriana.edu.co/biblos/tesis/ciencias/tesis14.pdf>
- comerma, J. (1984). *determinación de tamaño de partículas*. Obtenido de método de pipeta: http://www.sian.inia.gob.ve/repositorio/manuales_suelos/metodos_analiticos_suelos/II.pdf
- correa, a. m. (07 de septiembre de 2013). los dueños de los fertilizantes en Colombia. *el espectador*, pág. 1.
- DANE. (febrero de 2013). *insumos y factores a la producción agropecuaria*. Obtenido de Análisis del precio de los empaques agrícolas en Colombia: http://www.dane.gov.co/files/investigaciones/agropecuario/sipsa/insumos_factores_de_produccion_febrero_2013.pdf
- ecoplexity. (2010). *Teaching ecological complexity*. Obtenido de El nitrógeno del suelo : <http://ecoplexity.org/?q=node/599>
- Escobar. (2011). *scientia agropecuaria* .

- escobar, c. (11 de agosto de 2011). *Caracterización de cepas nativas de Azotobacter spp. y su efecto en el desarrollo de Lycopersicon esculentum Mill. "tomate" en Lambayeque.* Obtenido de file:///C:/Users/ANGIE/Downloads/Dialnet-CharacterizationOfNativeStrainsOfAzotobacterSppAnd-5113740%20(1).pdf
- fertiberia, g. (2014). *Abonos Nitrogenados Simples.* Obtenido de http://acm2.fertiberia.es/ACM2_upload/2-Productos/pdfs/gama_fertilizantes.pdf
- finagro. (agosto de 2014). *perspectiva del sector agropecuario.* Obtenido de <https://www.finagro.com.co/sites/default/files/Perspectivas%20Agropecuarias-v5.pdf>
- Furina, E. K. (2002). *reduction of nitrates by Azotobacter indicum and Azotobacter Chroococcum cultures.* Moscu: springer.
- Gauri, S. S. (2012). *Impact of Azotobacter exopolysaccharides on sustainable agriculture.* Kharagpur, India: Springer.
- hosny. (10 de agosto de 2010). *field evidence for the potential of Rhodobacter capsulatus as biofertilizer for flooded rice.* Obtenido de <http://link.springer.com/article/10.1007/s00284-010-9719-x#/page-1>
- ivanov. (21 de mayo de 2012). *production and use of biofertilizer based on poultry droppings.* Obtenido de <http://link.springer.com/article/10.3103/S106836741305008X#/page-1>
- Lara, C. (2007). Bacterias fijadoras asimbióticas fijadoras de nitrógeno en la zona agrícola de San Carlos Córdoba Colombia. *Revista colombiana de biotecnología*, 6-14.
- mirón, s. (26 de noviembre de 2009). *Biofertilizantes Sustentables.* Obtenido de Como forma de producción social, ambiental y económica: <https://sites.google.com/site/arkanuel/biofertilizantes>
- mojica, p. (agosto de 2014). *tecnologías relacionadas con biofertilizantes.* Obtenido de http://www.sic.gov.co/drupal/recursos_user/biofertilizantes.pdf
- Molina. (2011). *Nitrogeno y fertilizantes nitrogenados.* Obtenido de es.slideshare.net/javier-alfonso/nitrogeno-y-fertilizantes-nitrogenados?related=2

- molina, b. (2009). *Producción de un biofertilizante a partir de un aislamiento de Azotobacter nigricans obtenido en un cultivo de Stevia rebaudiana Ber.* Obtenido de <http://revistas.javeriana.edu.co/index.php/scientarium/article/view/1401>
- morel, p. (1971). materias primas para la producción de fertilizantes. En p. morel, *tecnologías de los fertilizantes* (pág. 26). Santiago de Chile: andres bello.
- navarro, s., & genis, n. (2003). formación y constituyentes del suelo aspectos generales. En s. navarro, & n. genis, *Química Agrícola* (pág. 15). Madrid: Mundi-Prensa.
- Nolasco, T. (22 de Marzo de 2015). *Cinética de crecimiento molecular*. Obtenido de Ecuación de Monod: <http://es.slideshare.net/edya69/ecuacin-de-monod-copia>
- peña, c. (01 de septiembre de 2000). *Influence of dissolved oxygen tension and agitation speed on alginate production and its molecular weight in cultures of Azotobacter vinelandii.* Obtenido de <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0141022900002210>
- posada, j. o. (diciembre de 2005). *fundamentos para el establecimiento de pasturas y cultivos forrajeros*. Obtenido de 2° edición: https://books.google.com.co/books?id=rbezH_RPHVYC&pg=PA152&lpg=PA152&dq=Fundamentos+para+establecimiento+de+pasturas+y+cultivos+forrajeros%2C&source=bl&ots=_7gb0JoS-o&sig=r8YSRLKeWZs4p0GsqX7IFpe3pml&hl=es-419&sa=X&ved=0ahUKEwiBrv7M283KAhXJ_R4KHSZpBTEQ6AEI
- rendon, m., bonilla, i., & bolaños, l. (s.f.). *fijación biológica del nitrógeno*. Obtenido de fijación biológica de nitrógeno en leguminosas: https://www.uam.es/personal_pdi/ciencias/bolarios/Investigacion/fijacionN.htm
- restrepo, j. l. (18 de febrero de 2015). *¿Una nueva revolución verde?* Obtenido de <http://www.portafolio.co/columnistas/una-nueva-revolucion-verde-ii-opinion>
- rojas, c. (s.f.). *interpretación de la disponibilidad de fósforo en los suelos de Chile*. La Platina: centro regional de investigación INIA La Platina.
- roveda, g., cabra, l., & ramirez, m. (2008). *uso de microorganismos con potencial como biofertilizantes en el cultivo de mora*. Mosquera: produmedios.

- santacruz, G. (julio de 2012). *introduccion al uso y manejo de los biofertilizantes en la agricultura*. Obtenido de <http://www.bioenergeticos.gob.mx/wp-content/uploads/2015/06/Introduccion-al-uso-y-manejo-de-los-biofertilizantes-en-la-agricultura.pdf>
- suarez, a. (s.f.). *biofertilizantes*. Obtenido de <http://www.ecured.cu/Biofertilizantes>
- sylvester. (04 de noviembre de 2014). *utilization of agro-wastes to produce biofertilizer*. Obtenido de <http://link.springer.com/article/10.1007/s40095-014-0147-8#page-1>
- upasana. (junio de 2004). *cyanobacteria: a potential biofertilizer for rice*. Obtenido de <http://link.springer.com/article/10.1007/BF02839213#page-1>
- vallejo, m. (14 de diciembre de 2007). *evaluacion de la asociacion bacterias fijadoras de nitrogeno - lineas interespecificas de arroz - nitrogeno, en Typic haplustalf*. Obtenido de http://www.revistas.unal.edu.co/index.php/acta_agronomica/article/view/1052/1564
- Villarreal, D. (21 de noviembre de 2012). *Fertilizantes Quimicos*. Obtenido de Concepto de Fertilizantes Quimicos: <http://ilovemyplanet123.blogspot.com.co/2012/11/que-es-un-fertilizante-las-plantas-para.html>
- Willson. (septiembre de 1943). *La competencia entre libre y combinado nitrógeno y nutrición de azotobacter*.