



UNIVERSIDAD JUÁREZ AUTÓNOMA DE TABASCO

“ESTUDIO EN LA DUDA. ACCIÓN EN LA FE”

DIVISIÓN ACADÉMICA DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



**“CARACTERIZACIÓN DE BACTERIAS FIJADORAS DE
NITRÓGENO Y EL EFECTO EN EL DESARROLLO DE
PLÁNTULAS DE EUCALIPTO (*E. grandis*)”**

TESIS

PARA OBTENER EL GRADO DE:

MAESTRO EN INGENIERÍA Y PROTECCIÓN AMBIENTAL

PRESENTA

I.Q. ANABEL GONZÁLEZ DÍAZ

DIRECTORES:

**DR. MIGUEL ÁNGEL HERNÁNDEZ RIVERA
M.C. REYNA LOURDES FÓCIL MONTECUBIO**

VILLAHERMOSA, TABASCO, MÉXICO

NOVIEMBRE DE 2015



UNIVERSIDAD JUÁREZ
AUTÓNOMA DE TABASCO

"ESTUDIO EN LA DUDA. ACCIÓN EN LA FE"

DIVISIÓN ACADÉMICA DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
DIRECCIÓN



OCTUBRE 15 DE 2015

C. ANABEL GONZÁLEZ DÍAZ
PAS. DE LA MAESTRÍA EN INGENIERÍA Y PROTECCIÓN AMBIENTAL
PRESENTE

En virtud de haber cumplido con lo establecido en los Arts. 80 al 85 del Cap. III del Reglamento de titulación de esta Universidad, tengo a bien comunicarle que se le autoriza la impresión de su Trabajo Recepcional, en la Modalidad de Tesis de Maestría en Ingeniería y Protección Ambiental titulado: **"CARACTERIZACIÓN DE BACTERIAS FIJADORAS DE NITRÓGENO Y EL EFECTO EN EL DESARROLLO DE PLÁNTULAS DE EUCALIPTO (*E. Grandis*)"**, asesorado por la M. en C. Reyna Lourdes Fócil Monterrubio y Dr. Miguel Ángel Hernández Rivera sobre el cual sustentará su Examen de Grado, cuyo jurado está integrado por la Dra. Erika Escalante Espinosa, M. en C. Rosa Martha Padrón López, M. en C. Reyna Lourdes Fócil Monterrubio, Dr. Miguel Ángel Hernández Rivera y M. en C. Carlos Alberto Torres Balcázar.

Por lo cual puede proceder a concluir con los trámites finales para fijar la fecha de examen.

Sin otro particular, me es grato enviarle un cordial saludo.

ATENTAMENTE
ESTUDIO EN LA DUDA. ACCIÓN EN LA FE

M. EN C. ROSA MARTHA PADRON LOPEZ
DIRECTORA

C.c.p.- Expediente del Alumno.
C.c.p.- Archivo

UJAT
DIVISIÓN ACADÉMICA
DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



DIRECCIÓN

CARTA AUTORIZACIÓN

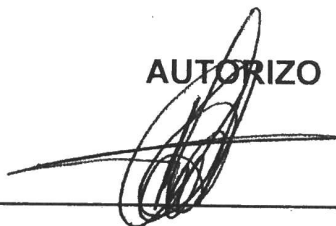
El que suscribe, autoriza por medio del presente escrito a la Universidad Juárez Autónoma de Tabasco para que utilice tanto física como digitalmente el Trabajo Recepcional en la modalidad de Tesis de Maestría denominado: **“CARACTERIZACIÓN DE BACTERIAS FIJADORAS DE NITRÓGENO Y EL EFECTO EN EL DESARROLLO DE PLÁNTULAS DE EUCALIPTO (*E. Grandis*)”**, de la cual soy autor y titular de los Derechos de Autor.

La finalidad del uso por parte de la Universidad Juárez Autónoma de Tabasco el Trabajo Recepcional antes mencionada, será única y exclusivamente para difusión, educación y sin fines de lucro; autorización que se hace de manera enunciativa más no limitativa para subirla a la Red Abierta de Bibliotecas Digitales (RABID) y a cualquier otra red académica con las que la Universidad tenga relación institucional.

Por lo antes manifestado, libero a la Universidad Juárez Autónoma de Tabasco de cualquier reclamación legal que pudiera ejercer respecto al uso y manipulación de la tesis mencionada y para los fines estipulados en este documento.

Se firma la presente autorización en la ciudad de Villahermosa, Tabasco el Día 15 de Octubre de 2015.

AUTORIZO



ANABEL GONZÁLEZ DÍAZ

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Juárez Autónoma de Tabasco, por brindarme la oportunidad de realizar mis estudios de Maestría en la División Académica de Ciencias Biológicas, por proporcionarme los conocimientos, habilidades y aptitudes para desarrollarme como Maestra en Ingeniería y Protección Ambiental y en especial por su responsabilidad y alto nivel académico.

Al Programa Educativo de la Maestría en Ingeniería y Protección Ambiental, por brindarme los espacios de infraestructura y académicos para realizar mis estudios.

A mis asesores de tesis Dr. Miguel Ángel Hernández Rivera y M.C. Reyna Lourdes Fócil Monterrubio por ser ejemplos de constancia en el trabajo, por todas sus enseñanzas, apoyo, paciencia, confianza, disposición, esmero y en especial por el valioso tiempo que dedicaron para la realización de este trabajo.

Agradezco a la M.C. Yolanda Córdova Bautista y M.I. Marcia Eugenia Ojeda Morales, por sus aportes, comentarios, consejos y su permanente apoyo para el logro del presente trabajo.

A la empresa Forestaciones Operativas Mexicanas S.A. de C.V. (FOMEX) por facilitarme el acceso a sus instalaciones y sistemas forestales.

Anabel González Díaz

DEDICATORIA

A Dios que es mi guía constante y me permitió llegar a esta etapa tan importante, por estar presente en cada paso que doy y por haber puesto en mi camino a personas que han sido soporte y compañía durante todo el periodo de estudio.

A mis padres y hermanos por su comprensión, confianza, apoyo incondicional y alegría, que representan un gran impulso para seguir adelante.

A José Luis González Borraz porque gracias a su apoyo he llegado a realizar un logro más en mi vida profesional.

Anabel González Díaz

ÍNDICE

ÍNDICE DE FIGURAS	7
ÍNDICE DE TABLAS	10
ÍNDICE DE ECUACIONES	11
GLOSARIO	12
I. RESUMEN	15
II. INTRODUCCIÓN	17
III. JUSTIFICACIÓN	20
IV. OBJETIVOS E HIPÓTESIS	23
Objetivo general	23
Objetivos específicos	23
Hipótesis	23
CAPÍTULO I. MARCO TEÓRICO.....	24
1.1 Generalidades del cultivo de eucalipto	24
1.1.1 Descripción de la especie	24
1.1.2. Características de la especie <i>Eucalyptus grandis</i>	25
1.1.3 Requerimientos ambientales de la especie <i>Eucalyptus grandis</i>	26
1.2 Producción y consumo de fertilizante químicos	26
1.2.1 Fertilización del cultivo de eucalipto en el sistema de agricultura intensiva	29
1.3 Biofertilizantes	31
1.4. Rizósfera	32
1.5 Bacterias promotoras del crecimiento vegetal (PGPR)	36
1.5.1 Mecanismos de acción de las PGPR	37
1.6 Fijación de nitrógeno	40
1.6.1 Microorganismos fijadores de nitrógeno	42
CAPÍTULO II. MATERIALES Y MÉTODO	48
2.1 ETAPA I. Trabajo de campo	49
2.1.1 Descripción del área de estudio	49
2.1.2 Selección de sitio de muestreo	49
2.1.3 Colecta y procesamiento de muestras de suelo	51
2.1.4 Colecta de sustratos orgánicos	51
2.2 ETAPA II. Caracterización fisicoquímica y microbiológica del suelo del cultivo de eucalipto	52
2.2.1 Materiales y equipos	52
2.2.2 Análisis de propiedades fisicoquímicas del suelo	53
2.2.3. Análisis microbiológico del suelo	54
2.3 ETAPA III. Selección de bacterias fijadoras de nitrógeno	58
2.4 ETAPA IV. Establecimiento del diseño experimental para la producción de biofertilizantes	64
2.4.1. Descripción de factores y niveles	64
2.4.2 Establecimiento de las unidades experimentales	65
2.4.3. Análisis de las características químicas de los biofertilizantes	67
2.5 ETAPA V. Evaluación de los biofertilizantes en condiciones de invernadero	68
2.5.1. Efecto de la aplicación de BFN sobre las características dasométricas de plántulas de eucalipto	69
2.5.2. Estudio de las propiedades químicas del suelo de macetas cultivado con eucalipto	70
2.6 ETAPA VI. Análisis estadístico de las variables respuesta	71

CAPÍTULO III. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	72
3.1. Características del suelo cultivado con eucalipto	72
3.1.1 Propiedades físicoquímicas de suelo cultivado con eucalipto	72
3.1.2. Tamaño de población de BFN en suelo rizosférico cultivado con eucalipto	73
3.2. Características macroscópicas y microscópicas de BFN del cultivo de Eucalipto	74
3.3 Producción de ácido indolacético (AIA)	78
3.4. Características químicas y biológicas de biofertilizantes durante el tiempo de incubación.....	79
3.4.1 pH en tratamientos.....	80
3.4.2 Carbono orgánico en tratamientos	82
3.4.3 Nitrógeno total en tratamientos	83
3.4.4 Unidades formadoras de colonias en tratamientos.....	86
3.5 Efecto por nivel de los factores sobre las características químicas y biológicas de biofertilizantes	89
3.5.1 Efecto por nivel de los factores en el pH de tratamientos	89
3.5.2. Efecto por nivel de los factores en el carbono orgánico de tratamientos	91
3.5.3. Efecto por nivel de los factores en el nitrógeno total de tratamientos.....	94
3.5.4. Efecto por nivel de los factores en las unidades formadoras de colonias de tratamientos.....	96
3.6. Evaluación de los biofertilizantes en condiciones de invernadero	99
3.6.1 Altura inicial de plántulas de <i>E. grandis</i>	99
3.6.2 Variables dasométricas de plántulas de <i>E. grandis</i> en condiciones de invernadero.....	101
3.6.3. Propiedades químicas del suelo con plántulas de <i>E. grandis</i> en condiciones de invernadero.....	120
CAPÍTULO IV. CONCLUSIONES	126
CAPÍTULO V. RECOMENDACIONES.....	128
LITERATURA CITADA	129
ANEXOS	149
Anexo A1. Muestreo para determinar fertilidad de suelos de acuerdo a la NOM-021-SEMARNAT-2000.....	149
Anexo A2. Preparación de la muestra de suelo a través del método AS-01 de la NOM-021-SEMARNAT-2000.	152
Anexo A3. Determinación de nitrógeno total del suelo a través del método AS-25 de la NOM-021-SEMARNAT-2000.....	154
Anexo A4. Determinación del fósforo extraíble en suelos neutros y ácidos a través del método AS-11 de la NOM-021-SEMARNAT-2000.	157
Anexo A5. Determinación de materia orgánica de suelo a través del método AS-07 de la NOM-021-SEMARNAT-2000.....	160
Anexo A6. Determinación del pH del suelo medido en agua a través del método AS-02 de la NOM-021-SEMARNAT- 2000.....	163
Anexo A7. Determinación del contenido de humedad del suelo a través del método AS-05 de la NOM 021-SEMARNAT-2000.	165
Anexo A8. Medición de la conductividad eléctrica a través del método AS-18 de la NOM-021-SEMARNAT-2000.	167
Anexo A9. Determinación de la densidad aparente del suelo a través del método AS-03 de la NOM-021-SEMARNAT-2000.....	170
Anexo A10. Medio de cultivo Rojo Congo	172

Anexo A11. Medio de cultivo Ashby	172
Anexo A12. Morfología de las colonias bacterianas.....	173
Anexo A13. Análisis de varianza del pH en tres tiempos (día 1, 30 y 60) después de la incubación, para tratamientos de a) BIO-AZP, b) BIO-AZT. ($p \leq 0.05$).....	174
Anexo A14. Análisis de varianza del CO en tres tiempos (día 1, 30 y 60) después de la incubación, para tratamientos de a) BIO-AZP, b) BIO-AZT. ($p \leq 0.05$).....	174
Anexo A15. Análisis de varianza del NT en tres tiempos (día 1, 30 y 60) después de la incubación, para tratamientos de a) BIO-AZP, b) BIO-AZT. ($p \leq 0.05$).....	175
Anexo A16. Análisis de varianza de las UFC en tres tiempos (día 1, 30 y 60) después de la incubación, para tratamientos de a) BIO-AZP, b) BIO-AZT. ($p \leq 0.05$).	175
Anexo A17. Efecto de los factores fuente de nitrógeno (FN), fuente de carbono FC y factor suelo (FS), sobre el pH de tratamientos de a) BIO-AZP, b) BIO-AZT, a 30 días de incubación.....	176
Anexo A18. Efecto de los factores fuente de nitrógeno (FN), fuente de carbono FC y factor suelo (FS), sobre el CO de tratamientos de a) BIO-AZP, b) BIO-AZT, a 30 días de incubación.	176
Anexo A19. Efecto de los factores fuente de nitrógeno (FN), fuente de carbono FC y factor suelo (FS), sobre el N_T de tratamientos de a) BIO-AZP, b) BIO-AZT, a 30 días de incubación.....	177
Anexo A20. Efecto de los factores fuente de nitrógeno (FN), fuente de carbono FC y factor suelo (FS), sobre las UFC de tratamientos de a) BIO-AZP, b) BIO-AZT, a 30 días de incubación.	177
Anexo A21. Análisis de varianza de la altura inicial de plántulas de <i>E. grandis</i>	178
Anexo A22. Análisis de varianza de la altura de plántulas de <i>E. grandis</i> sembradas en invernadero con seis tratamientos de fertilización.....	178
Anexo A23. Análisis de varianza del diámetro de tallos de plántulas de <i>E. grandis</i> sembradas en invernadero con seis tratamientos de fertilización.	179
Anexo A24. Análisis de varianza del número de hojas de plántulas de <i>E. grandis</i> sembradas en invernadero con seis tratamientos de fertilización.	180
Anexo A25. Análisis de varianza de la biomasa fresca de plántulas de <i>E. grandis</i> a 105 días de sembradas en invernadero con seis tratamientos de fertilización.....	181
Anexo A26. Análisis de varianza de la biomasa seca de plántulas de <i>E. grandis</i> a 105 días de sembradas en invernadero con seis tratamientos de fertilización.....	181
Anexo A27. Análisis de varianza del nitrógeno total en suelo con plántulas de <i>E. grandis</i> a 15, 60 y 105 días de ser sembradas en invernadero.....	182
Anexo A28. Análisis de varianza del fósforo disponible en suelo con plántulas de <i>E. grandis</i> a 15, 60 y 105 días de ser sembradas en invernadero.....	182
Anexo A29. Análisis de varianza de la materia orgánica en suelo con plántulas de <i>E. grandis</i> a 15, 60 y 105 días de ser sembradas en invernadero.....	183
Anexo A30. Análisis de varianza del pH en suelo con plántulas de <i>E. grandis</i> a 15, 60 y 105 días de ser sembradas en invernadero.	183

ÍNDICE DE FIGURAS

1.1	Producción Mundial de Fertilizantes (miles de toneladas), a) Nitrogenados, b) Fosfatados.	28
1.2	Consumo de fertilizantes químicos nitrogenados en América en el periodo 2002-2012.	28
1.3	Consumo de Fertilizantes en México.	28
1.4	Esquema de la rizósfera de una planta.	33
2.1	Esquema que sintetiza las etapas de la investigación.	48
2.1	Localización Geográfica del área de estudio.	50
2.2	Imágenes satelitales del área de estudio.	50
2.4	Preparación de muestras de suelo.	51
2.5	Sustratos orgánicos a) Suelo, b) Pollinaza y c) Material orgánico del cultivo de eucalipto.	52
2.6	Determinación de pH en muestras de suelo.	54
2.7	Medios de cultivo, a) Ashby y b) Rojo Congo.	56
2.8	Procedimiento para la determinación de viables usando diluciones seriadas de la muestra y el método de siembra por extensión en placa.	57
2.9	Células viables en unidades formadoras de colonias de a) <i>Azospirillum</i> sp, b) <i>Azotobacter</i> sp.	58
2.10	Análisis de la tinción de bacterias del género <i>Azotobacter</i> y <i>Azospirillum</i> en un microscopio binocular biológico con cámara digital.	60
2.11	Análisis morfológico de BFN en un microscopio electrónico de barrido.	61
2.12	Lavado de bacterias en caja de Petri, utilizando solución salina y asa bacteriológica.	62
2.13	Esquema del biorreactor utilizado para la reproducción de bacterias.	63
2.14	a) Inoculación de bacterias al biorreactor con ayuda de una jeringa estéril. b) Establecimiento de biorreactores para la reproducción de BFN.	64
2.15	Generación del diseño experimental factorial en software estadístico SAS.	65
2.16	Procedimiento de secado de plántulas de eucalipto para la determinación de peso seco de biomasa aérea y radical.	70
3.1	Morfología de las colonias de <i>Azotobacter</i> sp en placa, medio de cultivo Ashby.	76
3.2	Morfología de las colonias de <i>Azospirillum</i> sp en placa, medio de cultivo Rojo Congo.	76
3.3	Micrografías de microscopía óptica. Tinción de Gram de bacterias <i>Azotobacter</i> sp.	76
3.4	Micrografías de microscopía óptica. Tinción de Gram de bacterias <i>Azospirillum</i> sp.	77
3.5	Micrografías de microscopía electrónica de barrido. Morfología de bacterias <i>Azotobacter</i> sp.	77
3.6	Micrografías de microscopía electrónica de barrido. Morfología de	77

- bacterias *Azospirillum* sp.
- 3.7 Análisis de medias del pH en tres tiempos, a) BIO-AZP, b) BIO-AZT. ($p \leq 0.05$). 80
 - 3.8 Análisis de medias del carbono orgánico (%) en tres tiempos, a) BIO-AZP, b) BIO-AZT. ($p \leq 0.05$). 82
 - 3.9 Análisis de medias del nitrógeno total (%) en tres tiempos, a) BIO-AZP, b) BIO-AZT. ($p \leq 0.05$). 84
 - 3.10 a) Curva modelo de crecimiento poblacional microbiano, b) Curva de crecimiento de *Azospirillum* sp en BIO-AZP, c) Curva de crecimiento de *Azotobacter* sp en BIO-AZT. 87
 - 3.11 Efecto por nivel de los factores fuente de nitrógeno (FN), fuente de carbono FC y factor suelo (FS), sobre el pH de a) BIO-AZP, b) BIO-AZT, a treinta días de incubación. 90
 - 3.12 Efecto por nivel de los factores fuente de nitrógeno (FN), fuente de carbono FC y factor suelo (FS), sobre el contenido de carbono orgánico de a) BIO-AZP y b) BIO-AZT, a treinta días de incubación. 93
 - 3.13 Efecto por nivel de los factores fuente de nitrógeno (FN), fuente de carbono FC y factor suelo (FS), sobre el nitrógeno total de a) BIO-AZP y b) BIO-AZT, a treinta días de incubación. 96
 - 3.14 Efecto por nivel de los factores fuente de nitrógeno (FN), fuente de carbono FC y factor suelo (FS), sobre las unidades formadoras de colonias de a) BIO-AZP y b) BIO-AZT, a treinta días de incubación. 98
 - 3.15 Altura inicial de plántulas de *Eucalyptus grandis*, a 40 días en sistema de siembra suelo en vivero. 100
 - 3.16 Dinámica de crecimiento de *E. grandis* durante 105 días de sembradas en macetas. T1-BIO1: Biofertilizante Dosis 1; T2-BIO2: Biofertilizante dosis 2; T3-BIO3: Biofertilizante dosis 3; T4-BIO4: Biofertilizante dosis 4; T5-FQ: Urea; T6-T: Testigo. 101
 - 3.17 Plántulas de *E. grandis* después de 105 de establecidas en invernadero con biofertilizante nitrogenado a partir de *Azotobacter* sp y *Azospirillum* sp (T1-BIO1, T2-BIO2, T3-BIO3, T4-BIO4), fertilizante químico urea (T5-FQ) y sin fertilización (T6-T). 102
 - 3.18 Dinámica de crecimiento de tallos de plántulas de *E. grandis* a 105 días de sembradas en macetas. T1-BIO1: Biofertilizante Dosis 1; T2-BIO2: Biofertilizante dosis 2; T3-BIO3: Biofertilizante dosis 3; T4-BIO4: Biofertilizante dosis 4; T5-FQ: Urea; T6-T: Testigo. 106
 - 3.19 Tallos de plántulas de *E. grandis* después 105 días establecidas en invernadero con biofertilizante nitrogenado a partir de *Azotobacter* sp y *Azospirillum* sp (T1-BIO1, T2-BIO2, T3-BIO3, T4-BIO4), fertilizante químico urea (T5-FQ) y sin fertilización (T6-T). 108
 - 3.20 Dinámica de crecimiento de hojas en plántulas de *E. grandis* sembradas en macetas. T1-BIO1: Biofertilizante dosis 1; T2-BIO2: Biofertilizante dosis 2; T3-BIO3: Biofertilizante dosis 3; T4-BIO4: Biofertilizante dosis 4; T5-FQ: Urea; T6-T: Testigo. 110
 - 3.21 Ramas de plántulas de *E. grandis* después de 105 días de establecidas en invernadero con biofertilizante nitrogenado a partir de *Azotobacter* sp y *Azospirillum* sp (T1-BIO1, T2-BIO2, T3-BIO3, 111

- T4-BIO4), fertilizante químico urea (T5-FQ) y sin fertilización (T6-T).
- 3.22 Hojas de plántulas de *E. grandis* después de 105 días de establecidas en invernadero con biofertilizante nitrogenado a partir de *Azotobacter* sp y *Azospirillum* sp (T1-BIO1, T2-BIO2, T3-BIO3, T4-BIO4), fertilizante químico urea (T5-FQ) y sin fertilización (T6-T). 112
- 3.23 Peso fresco de la biomasa aérea y radical de *E. grandis* a 105 días de sembradas en macetas. T1-BIO1: Biofertilizante Dosis 1; T2-BIO2: Biofertilizante dosis 2; T3-BIO3: Biofertilizante dosis 3; T4-BIO4: Biofertilizante dosis 4; T5-FQ: Urea; T6-T: Testigo. 114
- 3.24 Peso seco de la biomasa aérea y radical de *E. grandis* a 105 días de sembradas en macetas. T1-BIO1: Biofertilizante Dosis 1; T2-BIO2: Biofertilizante dosis 2; T3-BIO3: Biofertilizante dosis 3; T4-BIO4: Biofertilizante dosis 4; T5-FQ: Urea; T6-T: Testigo. 115
- 3.25 Análisis de medias de la biomasa seca (g.plántula⁻¹) de plántulas de *E. grandis* de tratamientos, a) Biomasa aérea, b) Biomasa radical. ($p \leq 0.05$). 115
- 3.26 Desarrollo radical de plántulas de *E. grandis* después de 105 días de establecidas en invernadero con biofertilizante nitrogenado a partir de *Azotobacter* sp y *Azospirillum* sp (T1-BIO1, T2-BIO2, T3-BIO3, T4-BIO4), fertilizante químico urea (T5-FQ) y sin fertilización (T6-T). 116
- 3.27 Micrografías ópticas. Desarrollo de raíces secundarias en plántulas de *E. grandis* después de 105 días de establecidas en invernadero con biofertilizante nitrogenado a partir de *Azotobacter* sp y *Azospirillum* sp (T1-BIO1, T2-BIO2, T3-BIO3, T4-BIO4), fertilizante químico urea (T5-FQ) y sin fertilización (T6-T). 119
- 3.28 Contenido de nitrógeno total en suelo con plántulas de *E. grandis* a 15, 60 y 105 días de sembradas en macetas. T1-BIO1: Biofertilizante Dosis 1; T2-BIO2: Biofertilizante dosis 2; T3-BIO3: Biofertilizante dosis 3; T4-BIO4: Biofertilizante dosis 4; T5-FQ: Urea; T6-T: Testigo. 121
- 3.29 Contenido de fósforo en suelo con plántulas de *E. grandis* a 15, 60 y 105 días de sembradas en macetas. T1-BIO1: Biofertilizante Dosis 1; T2-BIO2: Biofertilizante dosis 2; T3-BIO3: Biofertilizante dosis 3; T4-BIO4: Biofertilizante dosis 4; T5-FQ: Urea; T6-T: Testigo. 121

ÍNDICE DE TABLAS

1.1	Composición de algunos fertilizantes químicos utilizados para la nutrición de especies vegetales.	27
1.2	Fertilización química en plantaciones de <i>Eucalyptus</i> .	30
1.3	Compuestos orgánicos y enzimas liberados por las plantas en los exudados radiculares y su función en la rizósfera.	34
1.4	Algunos microorganismos que habitan las diferentes regiones de la rizósfera.	35
1.5	Géneros de bacterias fijadoras de nitrógeno de vida libre.	42
1.6	Inoculaciones efectivas en variables de crecimiento de especies arbóreas.	43
2.1	Equipos, materiales y reactivos utilizados.	53
2.2	Descripción de tratamientos del bioensayo para la formulación de biofertilizantes nitrogenados.	65
2.3	Descripción de tratamientos y unidades experimentales del bioensayo para la formulación de biofertilizante nitrogenado inoculado con bacterias del género <i>Azospirillum</i> sp (BIO-AZP).	66
2.4	Descripción de tratamientos y unidades experimentales del bioensayo para la formulación de biofertilizante nitrogenado inoculado con bacterias del género <i>Azotobacter</i> sp (BIO-AZT).	66
2.5	Descripción de tratamientos y unidades experimentales en condiciones de invernadero.	68
2.6	Propiedades químicas medidas en suelo de macetas.	70
3.1	Características fisicoquímicas del suelo cultivado con <i>E. grandis</i> .	72
3.2	Número de bacterias diazotróficas del género <i>Azospirillum</i> sp y <i>Azotobacter</i> sp asociadas a <i>E. grandis</i> .	74
3.3	Características fenotípicas de bacterias del género <i>Azotobacter</i> sp, aisladas de suelo rizosférico de <i>E. grandis</i> .	75
3.4	Características fenotípicas de bacterias del género <i>Azospirillum</i> sp, aisladas de suelo rizosférico de <i>E. grandis</i> .	75
3.5	Producción de AIA por BFN de los géneros <i>Azospirillum</i> sp y <i>Azotobacter</i> sp.	79
3.6	Análisis de varianza de pH por combinación de factores de a) BIO-AZP y b) BIO-AZT, a treinta días de incubación. ($p \leq 0.05$).	89
3.7	Análisis de varianza del CO por combinación de factores de a) BIO-AZP y b) BIO-AZT, a treinta días de incubación. ($p \leq 0.05$).	92
3.8	Análisis de varianza del N _T por combinación de factores de a) BIO-AZP y b) BIO-AZT, a treinta días de incubación. ($p \leq 0.05$).	94
3.9	Análisis de varianza de las UFC por combinación de factores de a) BIO-AZP y b) BIO-AZT, a treinta días de incubación. ($p \leq 0.05$).	97
3.10	Propiedades químicas del suelo con plántulas de <i>E. grandis</i> a 15, 60 y 105 días de sembradas en macetas.	124

ÍNDICE DE ECUACIONES

1.1	Ecuación química de la reacción global de conversión de N_2 a NH_3 .	41
2.1	Modelo estadístico para el estudio de los niveles y factores de los biofertilizantes BIO-AZP y BIO-AZT sobre las variables respuesta.	66
2.2	Ecuación para la determinación de carbono orgánico.	67
2.3	Modelo de línea recta para el estudio de la tasa de crecimiento de las variables dasométricas de plántulas de <i>E. grandis</i> .	69
3.1	Modelo de superficie de respuesta para el pH de Bio-AZP.	90
3.2	Modelo de superficie de respuesta para el pH de Bio-AZT.	90
3.3	Modelo de superficie de respuesta para el carbono orgánico (CO) de BIO-AZP.	92
3.4	Modelo de superficie de respuesta para el carbono orgánico (CO) de BIO-AZT.	92
3.5	Modelo de superficie de respuesta para el nitrógeno total (N_T) de BIO-AZP.	95
3.6	Modelo de superficie de respuesta para el nitrógeno total (N_T) de BIO-AZT.	95
3.7	Modelo de superficie de respuesta para las unidades formadoras de colonias (UFC) de BIO-AZP.	97
3.8	Modelo de superficie de respuesta para las unidades formadoras de colonias (UFC) de BIO-AZT.	98

GLOSARIO

Azospirillum: Género de bacterias aerobias Gram-negativa, pertenece al grupo de rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal y tiene la capacidad de mejorar significativamente el crecimiento, desarrollo y rendimiento de numerosas especies vegetales de interés agrícola.

Azotobacter: Género de bacterias usualmente móviles, ovales o esféricas Gram-negativa, tiene aplicaciones biotecnológicas, es un fijador de nitrógeno de vida libre, promueve el crecimiento de raíces lo que conlleva a un aumento en la concentración de materia seca, contribuye con la solubilización de fosfatos y calcio, produce fitohormonas, sideróforos y sustancias antifúngicas.

Biofertilizante: Sustancias líquida o sólida que proviene de la fermentación de materiales orgánicos que contienen microorganismos con efectos positivos sobre algunos procesos de descomposición y síntesis que ocurren en el suelo.

Biorreactor: Recipiente en el cual se llevan a cabo reacciones bioquímicas y/o bioprocesos, ya sea con enzimas, microorganismos o con células vegetales y animales, todas estas especies se conocen como biocatalizadores.

Cepa: Grupo de organismos emparentados, como las bacterias, los hongos o virus, cuya ascendencia común es conocida.

Colonias: Agrupamiento de células en forma de masas visibles, sobre el agar de cultivo.

Consorcio: Agrupación de microorganismos.

Cultivo microbiano: Método de obtención de microorganismos o células mediante siembras controladas en medios adecuados.

Diluciones decimales: Suspensiones o soluciones obtenidas al mezclar un determinado volumen de la solución madre con un volumen de nueve veces un diluyente y que por repetición de esta operación con cada dilución así preparada, se obtiene la serie de diluciones decimales adecuadas para la inoculación de medios de cultivo.

Fertilidad: Calidad que permite a un suelo proporcionar los compuestos apropiados, en las cantidades debidas y en el balance adecuado para el

crecimiento de plantas específicas cuando otros factores, tales como la luz, temperatura y condiciones físicas del suelo, son favorables.

Fijación biológica de nitrógeno: La fijación biológica del nitrógeno atmosférico, consistente en la reducción de N_2 a NH_4^+ por la enzima nitrogenasa, es, después de la fotosíntesis, la ruta metabólica más importante para el mantenimiento de la vida en la biosfera. Este proceso crucial sólo puede ser llevado a cabo por unos pocos grupos de seres vivos, todos ellos procariotas.

Medio de cultivo: Solución que cuenta con los nutrientes necesarios para recuperar, multiplicar, aislar e identificar microorganismos bajo condiciones favorables de temperatura y pH.

Microorganismos: Organismos microscópicos constituidos por una célula o agrupación de células.

Nitrógeno total: Refleja la cantidad total de nitrógeno en el suelo, suma del nitrógeno orgánico en sus diversas formas (proteínas y ácidos nucleicos en diversos estados de degradación, urea, aminas, etc.) y el ion amonio NH_4^+ .

pH: Logaritmo negativo de la actividad de los iones de hidrógeno en el suelo. Índice que expresa el grado de acidez o alcalinidad de una disolución. Entre 0 y 7 la disolución es ácida, y de 7 a 14 es básica.

Pollinaza: Son los desechos sólidos de la producción de pollos de engorde, compuesto de la base o cama de los galpones, la excreta y los residuos de alimentos y plumas que queden en la cama. Se utiliza como abono debido a la riqueza química y de nutrientes que contiene. El 50% del nitrógeno presente en la pollinaza es proteína verdadera, la cual es alta en glicina y un poco bajo en arginina, lisina, metionina y cistina.

Rizósfera: Zona de interacción entre las raíces de las plantas y los microorganismos del suelo. Normalmente ocupa entre unos cuantos milímetros o algunos centímetros de la raíz. Esta región se caracteriza por el aumento de la biomasa microbiana y de su actividad. La comunidad de la rizósfera consiste en una microbiota (bacterias, hongos y algas) y una micro y mesofauna (protozoos, nematodos, insectos y ácaros).

Salinidad: Concentración de sales en el perfil del suelo que puede afectar el crecimiento y desarrollo de los cultivos.

Solución madre: Es la solución, suspensión o emulsión obtenida después de pesar o medir una cantidad del producto bajo examen y mezclarla con una cantidad de nueve veces en proporción de diluyente.

Suelo ácido: Específicamente un suelo con pH menor a 7.0 originado por la presencia de iones activos de hidrógeno y/o aluminio. El valor del pH disminuye a medida que aumenta la actividad de esos dos iones.

Sustrato: Sustancia sobre la que actúa una enzima.

Unidades Formadoras de Colonias (UFC): Término que debe utilizarse para reportar la cuenta de colonias en placa, las cuales pueden surgir de una célula o de un cúmulo de células.

I. RESUMEN

Los biofertilizantes son preparados de microorganismos vivos, que tienen la capacidad estimular el crecimiento vegetal a través de diferentes procesos como la síntesis de reguladores del crecimiento vegetal, la fijación de nitrógeno, solubilización y movilización de nutrientes e inhiben los efectos de microorganismos patógenos del suelo. En este estudio se elaboró un biofertilizante a base de subproductos agrícolas (pollinaza y hojarasca de eucalipto) y suelo, inoculados con bacterias fijadoras de nitrógeno (BFN) de los géneros *Azotobacter* sp y *Azospirillum* sp. El muestreo se realizó en una plantación forestal de *E. grandis* en un área de 1.5 ha, de la empresa Forestaciones Operativas Mexicanas, S.A. de C.V. ubicada en el municipio de Huimanguillo, Tabasco. Las muestras fueron tomadas de 10 puntos; suelo rizosférico y a distancia, con el fin de obtener las bacterias *Azotobacter* sp y *Azospirillum* sp.

Para la formulación de los biofertilizantes se estableció un diseño experimental con arreglo factorial (2x2x2) para un total de 8 tratamientos con 4 repeticiones, los factores fueron fuente de nitrógeno FN (pollinaza), fuente de carbono FC (hojarasca de eucalipto) y fuente de micronutrientes FS (suelo) con dos niveles de dosis, inoculados con un consorcio de BFN. Para el estudio del efecto de los biofertilizantes sobre las variables dasométricas de plántulas de *E. grandis*, se estableció un diseño experimental unifactorial completamente al azar, los tratamientos evaluados fueron T1-BIO1; T2-BIO2; T3-BIO3; T4-BIO4 (correspondientes a cuatro dosis de biofertilizante), T5-FQ (dosis de fertilizante químico urea) y T6-T (testigo sin fertilización), con 4 réplicas por tratamiento.

Los aislados permitieron obtener ocho cepas de AZP y ocho cepas de AZT, la mayor producción de compuestos indólicos del tipo AIA correspondieron a seis cepas: AZP1 ($42.80 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$), AZP2 ($39.10 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$), AZP5 ($40.70 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$), AZT1 ($40.15 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$), AZT3 ($31.40 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) y AZT4 ($34.3 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$). El ANOVA ($p \leq 0.05$), expuso que el tiempo óptimo para la producción de biofertilizantes se alcanzó a los 30 días de establecido el bioensayo, encontrándose la mayor densidad de *Azospirillum* sp (BIO-AZT3: $1.93 \times 10^7 \text{ UFC}\cdot\text{mL}^{-1}$) y de *Azotobacter* sp

(BIO-AZP2: 9.23×10^6 UFC·mL⁻¹) y contenidos de nitrógeno total en un rango de 2.15-5.64%.

El tratamiento que tuvo el efecto más significativo en el desarrollo de las plántulas fue el T4-BIO4, con tasas de crecimiento de 0.701 cm de altura, 0.075 mm de diámetro de tallo y 3.61 hojas en promedio por unidad de tiempo, y estimuló el enraizamiento de las plántulas en vivero, poniendo de manifiesto la efectividad de la inoculación con bacterias BFN. Los resultados obtenidos en este estudio demuestran la hipótesis propuesta, relacionada con la producción de un biofertilizante a base de subproductos agrícolas y bacterias nativas de la rizósfera de eucalipto que contribuyen al rendimiento del cultivo, y se plantean como alternativa para el sector forestal en caso de que se pretenda implementar un manejo sustentable del suelo en las regiones forestales del Estado de Tabasco.

Palabras clave: *Azotobacter*, *Azospirillum*, biofertilizante, eucalipto.

II. INTRODUCCIÓN

El género *Eucalyptus* es originario de Australia y pertenece a la familia de las Mirtáceas, que comprenden una enorme diversidad biológica, con más de 700 especies distribuidas en regiones, esencialmente de climas mediterráneos, tropicales y subtropicales. El eucalipto es la fuente principal de materia prima para diferentes industrias, gracias a su rápido crecimiento (3 a 6 metros por año), versatilidad y fácil adaptación a diversos climas y ambientes, con resultados que se pueden resumir en alta rentabilidad. La producción de madera justifica su interés económico, por lo general, entre 10 y 30 metros cúbicos por hectárea por año (Geilfus, 1994). Actualmente, es cultivado a nivel mundial como una fuente de fibra para producir pulpa de celulosa, papel, madera aserrada, chapas y tableros, productos de ingeniería, entre otros (INFOR, 2010). En México existen alrededor de 25,000 ha de eucalipto, las principales regiones productoras son Huimanguillo, Tabasco y Las Choapas, Veracruz, con aproximadamente 15,000 ha entre ambas (Pérez *et al.*, 2005).

En Tabasco, la producción de plántulas de eucalipto, se realiza convencionalmente con la aplicación de fertilizantes químicos, y es una práctica habitual en muchos países, mediante la cual puede incrementarse significativamente el crecimiento inicial (Messina, 1992; Gaitán *et al.*, 2004; Smethurst *et al.*, 2003; Monsalve *et al.*, 2009; Forrester *et al.*, 2012a; García & De La Peña, 2013). Especialmente se aplican elevadas concentraciones de nitrógeno, que es un macroelemento esencial para las plantas, ya que forma parte de compuestos tan fundamentales como proteínas, enzimas, ácidos nucleicos y clorofila, necesitándose principalmente en los tejidos vegetales en crecimiento e interviene en la multiplicación celular y se considera factor de crecimiento y desarrollo (Urzúa, 2005; Córdova *et al.*, 2013; García *et al.*, 2010; Mayz, 2004; Carvajal & Mera, 2010; Wu *et al.*, 2005).

Algunos estudios han expuesto que la fertilización nitrogenada aumenta significativamente la biomasa aérea y radical, otorgando mejores atributos morfológicos como el crecimiento en diámetro de cuello y altura de plantas (Monsalve *et al.*, 2009; Forrester *et al.*, 2012a). A la fecha las prácticas agrícolas

en México, y otras partes del mundo, han tenido como objetivo el maximizar los rendimientos de los cultivos, sin considerar el deterioro ambiental que se pudiera ocasionar por el uso desmedido de los insumos. Las nuevas variedades de alto rendimiento exigen mejores condiciones de cultivo y altos niveles de fertilización, lo que ocasiona mayores índices de salinización cada año, asociado a inhibición del crecimiento de cultivos y contaminación del agua subterránea, resultando en un serio peligro para la salud de las personas; además de que el proceso de elaboración de fertilizantes es costoso (Urzua, 2005; Rueda *et al.*, 2009). En este sentido se hace necesaria la búsqueda de otras opciones de manejo que contribuyan a una agricultura más sana.

Los biofertilizantes basados en microorganismos rizosféricos son una alternativa emergente a los fertilizantes químicos inorgánicos para incrementar la fertilidad y producción de cultivos en agroecosistemas sustentables (Wu *et al.*, 2005). Las bacterias benéficas de vida libre son usualmente denominadas rizobacterias promotoras del crecimiento de plantas (PGPR, por sus siglas en inglés). Los mecanismos de acción de las PGPR pueden clasificarse en directos e indirectos, y cada uno de ellos puede actuar de manera independiente, con la capacidad de promover respuestas fisiológicas específicas en las células vegetales y realizar funciones de control biológico (Rao *et al.*, 2000; Voinnet, 2005; Camelo *et al.*, 2011; Glick, 2012; Gómez *et al.*, 2012). A pesar del restringido estudio de las interacciones PGPR-plantas, un número de estas bacterias se utilizan comercialmente como complemento en las prácticas agrícolas (Lucy *et al.*, 2004; Banerjee *et al.*, 2006). Las cepas de PGPR que han sido comercializadas son *Azospirillum brasilense*, *Azospirillum lipoferum*, *Azotobacter chroococcum*, *B. fimus*, *B. licheniformis*, *B. megaterium*, *B. mucilaginosa*, *B. pumilus*, *B. subtilis*, *B. cepacia*, *acidovorans Delftia*, *P. macerans*, *P. agglomerans*, *P. aureofaciens*, *P. chlororaphis*, *P. fluorescens*, *P. solanacearum*, *P. syringae*, *S. entomophila*, *Streptomyces lydicus* y *Rhizobia* spp. Sin embargo, la inoculación de PGPR sobre cultivos, actualmente representa sólo una pequeña fracción de las prácticas agrícolas en todo el mundo (Glick, 2012). Por lo que el objetivo de esta investigación fue evaluar el efecto de la inoculación de *Azotobacter* sp y

Azospirillum sp sobre el crecimiento, desarrollo y rendimiento de plántulas de *E. grandis* en condiciones de vivero.

Universidad Juárez Autónoma de Tabasco.
México.

III. JUSTIFICACIÓN

En México se estima que existen 10.7 millones de hectáreas de plantaciones comerciales; de éstas, el 50% se encuentra en el sureste mexicano, específicamente en la región conocida como Golfo Sureste, que comprende los estados de Tabasco, Oaxaca, Veracruz y la Península de Yucatán, el manejo agronómico de las plantaciones es de tipo convencional (INEGI, 2007; CONAFOR, 2015).

La Comisión Nacional Forestal pone a disposición los instrumentos de certificación forestal, que es un proceso voluntario, por medio del cual se evalúa el desempeño de las operaciones forestales a través de los diferentes instrumentos de certificación, que se incorporan en el "Sistema Nacional de Certificación Forestal y Cadena de Custodia" y tiene como objeto, facilitar la incorporación de los productores forestales a un proceso de certificación gradual, así como el promover que los productores forestales procedan de bosques manejados sustentablemente (CONAFOR, 2015). Al respecto, el Plan de Desarrollo Estatal Tabasco 2013-2018, en su eje rector uno menciona que es necesario incrementar los rendimientos de la producción en plantaciones forestales comerciales, considerando un manejo sustentable. En este contexto, el mantenimiento de la capacidad productiva del suelo requiere integrar prácticas de nutrición vegetal y de mejoramiento del suelo que permitan un manejo adecuado de los nutrimentos para evitar su carencia o pérdidas por lixiviación, y de la materia orgánica para potenciar la biodiversidad edáfica y optimar las variables edáficas ligadas a su conservación (Álvarez *et al.*, 2010). Actualmente se utilizan diferentes microorganismos con funciones específicas en la agricultura para mejorar la productividad de especies vegetales, pudiendo ser una herramienta muy útil para una agricultura sustentable (Armenta *et al.*, 2010). Todos son una fuente facilitadora del manejo de los nutrimentos que benefician el funcionamiento de los cultivos y forman parte de una tecnología que garantiza una productividad biológica, económica y ecológica más exitosa y sin contaminación del ambiente y de inocuidad reconocida para el hombre (Aguirre *et al.*, 2009).

La experiencia generada con diferentes especies vegetales, ha demostrado que en la fase de producción de plantas en vivero se pueden utilizar biofertilizantes en sustitución de productos de síntesis química (Díaz *et al.*, 2009; Rivera *et al.*, 2010; Adriano *et al.*, 2011). La mayoría de los estudios exponen la capacidad biofertilizante de *Azospirillum* sp y *Azotobacter* sp sobre cereales, flores, cítricos, gramíneas y leguminosas (Lucy *et al.*, 2004; Armenta *et al.*, 2010). Sin embargo, se han obtenido resultados favorables con la aplicación individual o con la combinación de microorganismos benéficos, con inoculaciones exitosas sobre especies arbóreas y forestales, que han dado resultados satisfactorios como incrementos en la tasa de germinación, altura, peso fresco, longitud radicular, mayor número de pelos y raíces adventicias y secundarias, incrementos en área foliar, repercutiendo en mayores índices de fotosíntesis y por consiguiente en una mayor producción; incrementos en floración, aumento en niveles de nitrógeno, expresados en proteína en el follaje y producción de auxinas en la raíz (Rodríguez *et al.*, 1991; Zaady & Perevolotskyb, 1995; Dunstan *et al.*, 1998; Sastry *et al.*, 2000; Mason *et al.*, 2000; Felker *et al.*, 2005; Chen *et al.*, 2006; Zambrano & Díaz, 2008; Díaz *et al.*, 2009; Orozco & Martínez, 2009; Obando *et al.*, 2010; Sayed, 2011; Aguirre *et al.*, 2011; Liu *et al.*, 2013; Fatemeh *et al.*, 2014).

Los biofertilizantes están constituidos por microorganismos vivos; los cuales, cuando se aplican a superficies de plantas, colonizan la rizósfera y promueven el crecimiento al incrementar la disponibilidad de nutrientes a la planta huésped, no contaminan los productos vegetales, ni el suelo; por el contrario, son regeneradores de éste, además algunos inducen el desarrollo de mecanismos de defensa de las plantas y generan ambientes adversos a patógenos (Vessey, 2003; Rivera *et al.*, 2010; Glick, 2012). El desarrollo de un biofertilizante involucra la selección de un sustrato orgánico que mantenga el crecimiento de las PGPR y que, al inocularlo en el suelo, las poblaciones de bacterias sean viables. En este sentido, las PGPR sostenidas en sustratos orgánicos nativos, tienen grandes posibilidades para el desarrollo de biofertilizantes para la producción de cultivos de interés y pueden contribuir sustancialmente a que los agricultores economicen en

fertilizantes nitrogenados conservando el medio ambiente (Lucy *et al.*, 2004; Lara *et al.*, 2007; Córdova *et al.*, 2009).

Universidad Juárez Autónoma de Tabasco.
México.

IV. OBJETIVOS E HIPÓTESIS

Objetivo general

Determinar el efecto de las bacterias fijadoras de nitrógeno (BFN) de la rizósfera del eucalipto (*Eucalyptus grandis*) contenidas en un biofertilizante sobre las variables dasométricas de plántulas de eucalipto.

Objetivos específicos

1. Aislar, caracterizar y seleccionar bacterias fijadoras de nitrógeno asimbióticas asociadas al eucalipto.
2. Formular biofertilizantes a partir de sustratos orgánicos del cultivo de eucalipto, pollinaza, suelo y bacterias fijadoras de nitrógeno, para su uso en la producción de eucalipto.
3. Comparar la efectividad de distintas formulaciones y dosis de biofertilizantes en condiciones de invernadero.

Hipótesis

Las poblaciones de bacterias fijadoras de nitrógeno se establecen en los soportes hojarasca de eucalipto, pollinaza y suelo aumentando los contenidos de nitrógeno total y contribuyen al rendimiento de las plántulas de eucalipto.

CAPÍTULO I. MARCO TEÓRICO

1.1 Generalidades del cultivo de eucalipto

1.1.1 Descripción de la especie

El nombre botánico del eucalipto es *Eucalyptus spp*, pertenece a la familia de las Mirtáceas, que está constituida por un grupo de árboles o arbustos perennifolios, ricos en aceites esenciales, perteneciente al orden Myrtales (FAO, 1981; Geilfus, 1994). Se conocen más de 500 especies diferentes de eucaliptos, de las cuales casi la totalidad son originarios de Australia, y algunos de Nueva Guinea y las islas vecinas. Varias especies están entre los árboles más difundidos y cultivados en el mundo, en los climas tropicales, subtropicales y templados (mediterráneos). Esto se debe a sus excelentes calidades, como su rápido crecimiento, tronco erecto, resistencia a la sequía, entre otras. Para cada tipo de clima y de suelo se puede encontrar algunas especies de eucaliptos adecuadas, hay especies adaptadas a todos los climas, excepto los más fríos, sin embargo son especies principalmente tropicales y subtropicales (Geilfus, 1994; González *et al.*, 1997; Guerra, 2012).

La mayoría son árboles grandes (entre ellos están los maderables más grandes conocidos), y casi todos contienen productos aromáticos (resinas y gomas). Las hojas son generalmente alternas, alargadas, color verde brillante o grisáceo. Las flores aparecen en racimos “pompones”. Los frutos son pequeñas cápsulas que se abren, dejando caer las semillas minúsculas (algunas especies tienen varios millones de semillas por kilogramo). Los australianos agrupan los eucaliptos en 4 clases, según el tipo de corteza: maderos rojos, con corteza que se despega por láminas o escamas y madera roja; gomos, con corteza lisa; corteza de hierro, con corteza negruzca, dura y surcada; corteza filosa, con corteza gorda y fibrosa (FAO, 1981; Geilfus, 1994).

Los usos de los eucaliptos son múltiples; todas las especies reúnen diferentes usos. La madera es generalmente dura, resistente a plagas por su contenido en aceites aromáticos. Solamente una minoría da madera de aserrío, porque en general se rompe y deforma al secar. Los eucaliptos dan una de las mejores leñas, y hay plantaciones para leña y carbón extensas en muchos países. Son los árboles comúnmente plantados para rompevientos, principalmente en zonas

áridas y semi-áridas. Varias especies se plantan a nivel industrial para obtención de pulpa de papel. Se encuentran dentro de las especies más difundidas para plantaciones de ornato y belleza. Algunas especies (*E. citriodora*, *E. smithii*, *E. maideni*) dan productos utilizados en perfumería. La corteza de varias especies tiene alto contenido en taninos, que se utilizan para el curtido de pieles y otros usos industriales (*E. robusta*). Se utilizan para reforestación de sitios difíciles (dunas) y también para la recuperación de suelos pantanosos (Geilfus, 1994).

Los eucaliptos difundidos en el mundo son especies de crecimiento rápido, en buenos sitios se registran crecimientos de 3 a 6 metros por año. La producción de madera justifica su interés económico, por lo general, entre 10 y 30 metros cúbicos por hectárea por año, pero ocurren producciones de 50 metros cúbicos y más (Geilfus, 1994). Debido a la herencia transmitida por sus predecesores y el curso de la evolución en los recientes milenios los eucaliptos han desarrollado características de crecimiento que han hecho de ellos un factor fundamental para la perpetuación de un recurso forestal sometido a las difíciles condiciones ambientales (FAO, 1981).

En México existen alrededor de 25,000 ha de eucalipto, las principales regiones productoras son Las Choapas, Veracruz y Huimanguillo, Tabasco, con aproximadamente 15,000 ha entre ambas (Pérez *et al.*, 2005). Las plantaciones de eucalipto en el municipio de Huimanguillo, Tabasco, corresponden a *Eucalyptus grandis* (género estudiado en esta investigación), *Eucalyptus pellita* F. Muell y *Eucalyptus urophylla* (Pérez, 2010; Uribe, 2012; Doporto, 2014).

1.1.2. Características de la especie *Eucalyptus grandis*

Eucalyptus grandis es una especie originaria de la Costa Este de Australia, muy plantada en zonas subtropicales, es un árbol de crecimiento rápido, con 45-50 m de altura, con tronco recto y corteza blanca. En rodales naturales, puede alcanzar 50-60 m de altura, con un diámetro de tronco de hasta 2 m la especie se adapta a una amplia gama de tipos de suelo. *E. grandis* es importante en la producción de papel, dado que su pulpa es más clara y suave en comparación con la de otras especies de eucalipto (NAS, 1983; Gelfius; 1994; Boland *et al.*, 2006).

1.1.3 Requerimientos ambientales de la especie *Eucalyptus grandis*

La distribución de *E. grandis* va desde el nivel del mar hasta los 800 m. Necesita un clima que presente temperaturas del mes más cálido/más frío de 40°C/-1 a -3°C. En la plantación, la especie puede sobrevivir heladas si la temperatura cae gradualmente durante varias semanas, la congelación súbita es muy perjudicial. Requiere entre 1000 y 1800 mm de lluvia, con estación seca. Se desarrolla en suelos húmedos y bien drenados, derivados de una variedad de sustratos como esquistos, pizarras, areniscas, granito y basalto, tolera rangos de pH de 5.5 a 7.5 (FAO, 1981; NAS, 1983; Gelfius, 1994).

1.2 Producción y consumo de fertilizante químicos

El auge en la producción intensiva se debe principalmente a los avances científicos e innovaciones tecnológicas que incluyen el uso de fertilizantes y plaguicidas, que son de las principales prácticas de la agricultura convencional (Tabla 1.1). No obstante, no se han considerado las consecuencias a largo plazo ni la dinámica ecológica de los agroecosistemas (Gliessman, 2002). A la fecha las prácticas agrícolas en México, y otras partes del mundo, han tenido como objetivo maximizar los rendimientos de los cultivos, sin considerar el deterioro ambiental que se pudiera ocasionar por el uso desmedido de los insumos (Martínez *et al.*, 2006; Morales, 2008).

En México los agricultores han utilizado los fertilizantes químicos sintéticos, por su bajo costo y amplia distribución nacional entre los productores, incluso fueron subsidiados por el gobierno federal, la intensidad y frecuencia de la aplicación de estos fertilizantes causan deterioro en la rizósfera de los suelos agrícolas (Aguirre *et al.*, 2009).

La International Fertilizer Asociation (IFA) ha reportado la producción de fertilizantes sintéticos a nivel mundial (Figura 1.1). Destaca la mayor producción de urea y amonía. La alta producción de estos fertilizantes químicos es mediada por el consumo de los mismos, y depende en gran medida de las características de los fertilizantes principalmente de su composición, solubilidad y rendimiento (Tabla 1.1).

Tabla 1.1. Composición de algunos fertilizantes químicos utilizados para la nutrición de especies vegetales (IFA, 2013).

Nombre común	N	P ₂ O ₅	K ₂ O	S	MgO
<i>Nutrientes como % del producto</i>					
Fertilizantes Nitrogenados					
Amoníaco	82.00	0.00	0.00	0.00	0.00
Sulfato de amonio	21.00	0.00	0.00	23.00	0.00
Nitrato de Amonio	33-34.5	0.00	0.00	0.00	0.00
Nitrato de Amonio de Calcio	20.4-27	0.00	0.00	0.00	0.00
Urea	45-46	0.00	0.00	0.00	0.00
Fertilizantes Fosfatados					
Superfosfato simple	0.00	16-20	0.00	12.00	0.00
Superfosfato triple	0	46.00	0.00	0.00	0.00
Fosfato de diamonio	18.00	46.00	0.00	0.00	0.00
Fosfato monoamónico	11.00	52.00	0.00	0.00	0.00
Fosfato natural	0.00	20-40	0.00	0.00	0.00
Fertilizantes Potásicos					
Cloruro de potasio	0.00	0.00	60.00	0.00	0.00
Sulfato de potasio	0.00	0.00	50.00	18.00	0.00
Sulfato de potasio y magnesio	0.00	0.00	22-30	17-22	41953.00
Fertilizantes de magnesio					
Kieserita	0.00	0.00	0.00	20-22	25-27
Sal de Epsom	0.00	0.00	0.00	41609.00	15-16
Fertilizantes complejos					
NP fertilizantes	15-25	15-25	0.00	*	0.00
NK fertilizantes	13-25	0.00	15-46	*	0.00
PK fertilizantes	0.00	11140.00	11232.00	*	*

* Algunos con S o Mg y otros micronutrientes.

Según la IFA, el consumo de fertilizantes nitrogenados en América mostró un ligero aumento en el periodo de 2002 a 2012, en la Figura 1.2 se observa el consumo (miles de toneladas) de los principales fertilizantes nitrogenados, siendo la urea el de mayor consumo por tener una alta concentración de nitrógeno de 45-46% de N en forma amídica (IFA, 2013). En la Figura 1.3 se aprecia el porcentaje de consumo de fertilizantes en México, según su tipo, siendo los nitrogenados los más utilizados, esto puede atribuirse a su alta aportación de nitrógeno, el cual se encuentra dentro del grupo de los macronutrientes necesarios para el crecimiento de las plantas (IFA, 2013).

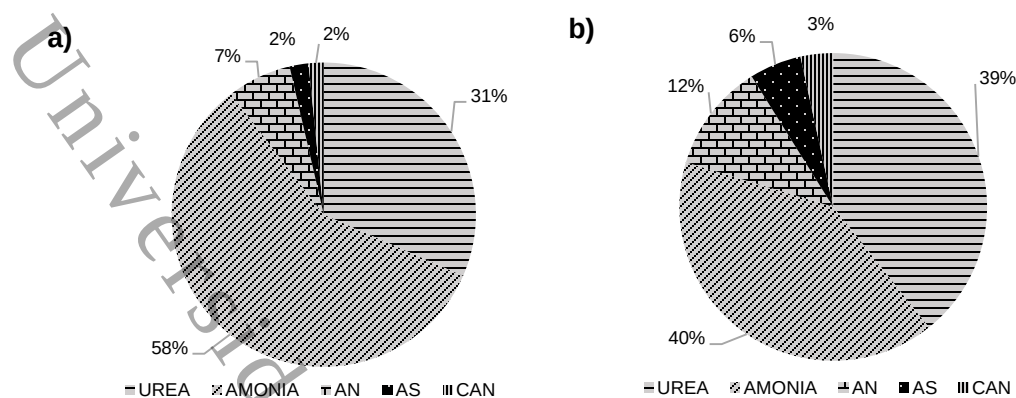


Figura 1.1. Producción Mundial de Fertilizantes (miles de toneladas), a) Nitrogenados, b) Fosfatados. Fuente: Elaboración propia con datos de la International Fertilizer Association (IFA, 2013).

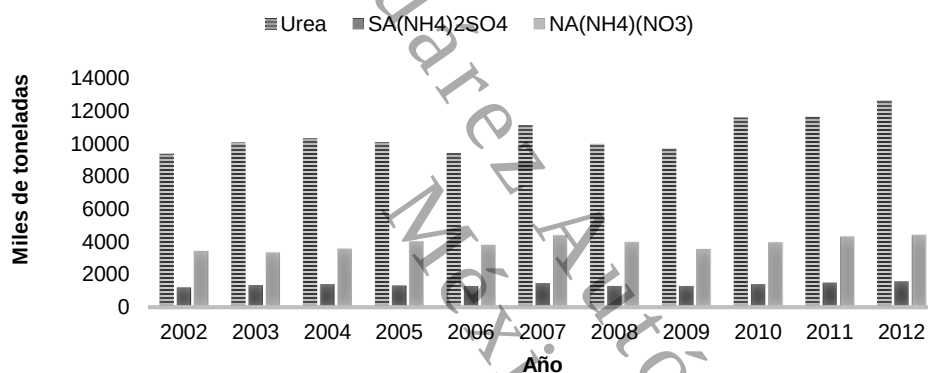


Figura 1.2. Consumo de fertilizantes químicos nitrogenados en América en el periodo 2002-2012 (Datos en miles de toneladas).

Fuente: Elaboración propia con datos de la International Fertilizer Association (IFA, 2013).

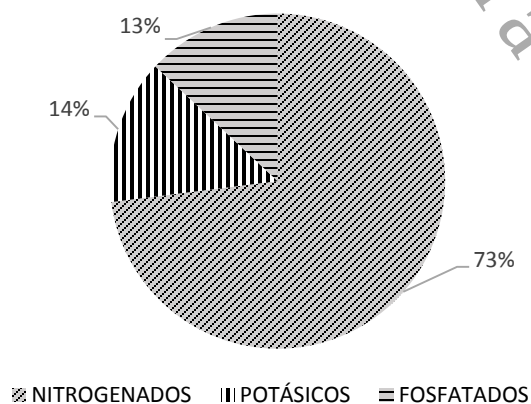


Figura 1.3. Consumo de Fertilizantes en México (IFA, 2013).

A pesar de su éxito en los sistemas de producción, los fertilizantes, se encuentran en el proceso de erosionar las bases esenciales que los sostienen, pues las prácticas agrícolas convencionales han abusado y degradado los recursos naturales de los que depende la agricultura: suelo, agua y diversidad genética. Por el contrario, existen estudios que han aplicado algunas biotecnologías en el rendimiento de los cultivos, por ejemplo el uso de biofertilizantes, que juegan un papel fundamental en la nutrición vegetal, pues la aplicación de éstos permite mantener o mejorar el equilibrio de elementos en el suelo para alcanzar altos rendimientos (Dimkpa *et al.*, 2009).

1.2.1 Fertilización del cultivo de eucalipto en el sistema de agricultura intensiva

El mantenimiento de la capacidad productiva del suelo requiere integrar prácticas de nutrición vegetal y de mejoramiento del suelo que permitan un manejo adecuado de los nutrimentos para evitar su carencia o pérdidas por lixiviación. La fertilización es la técnica más eficiente para acelerar el crecimiento y aumentar la supervivencia, tanto de la planta en vivero como de las masas de eucalipto una vez establecidas en el campo. En términos operacionales, pueden distinguirse tres tipos de fertilización cuando ésta se realiza sobre masas de eucaliptos ya establecidas: a) Fertilización inicial o de arranque; b) fertilización de mantenimiento o a mediana edad; c) Fertilización de brotación o post-aprovechamiento (De Barros, 1997). La aplicación de cualquiera de ellas exige el conocimiento de la demanda nutricional de la planta en cada momento, además de la capacidad del terreno para asegurar dicha nutrición en la cantidad y tiempo adecuados (Tabla 1.2).

Las mayores demandas nutricionales ocurren en la primera fase de crecimiento, desde la plantación hasta el cierre de copas, donde predomina la formación de tejidos productores de clorofila, sin embargo, el manejo nutricional debe continuar durante toda la rotación (Pozo, 2005) (Tabla 1.2). La aplicación de fertilizantes al momento de la plantación en eucaliptos es una práctica habitual en muchos países, mediante la cual puede incrementarse significativamente el crecimiento

inicial (Gaitán *et al.*, 2004). La fertilización tiene como objetivos: lograr mayor desarrollo y homogeneidad inicial de las plantas para que éstas cubran más rápidamente el suelo y mejorar la capacidad del sitio, lo que se traduce en un aumento de la producción de madera al final de la rotación y/o en un acortamiento del ciclo. Existen antecedentes en los que se ha demostrado el mantenimiento de la respuesta a la fertilización inicial, determinando una mayor producción al momento de la cosecha (Schönau & Pennefather, 1975; Schönau, 1977; Herbert, 1983).

Tabla 1.2. Fertilización química en plantaciones de *Eucalyptus* (Adaptado de Forrester, 2013a).

Especie	Edad de la plantación (años)	Densidad (Árboles·ha ⁻¹)	Dosis de fertilizante	Tipo de fertilización	Autores
<i>E. nitens</i>	1	1430	100-300 kg N·ha ⁻¹ + 150 kg P·ha ⁻¹	N:P	Smethurst <i>et al.</i> , (2003)
<i>E. nitens</i>	1	1000	170 N + 110 P +50 K kg·ha ⁻¹	N:P:K	Forrester <i>et al.</i> , (2012a)
<i>E. nitens</i> y <i>E. globulus</i>	3.7	1000	100-500 kg N·ha ⁻¹	N	Wiseman <i>et al.</i> , (2009)
<i>E. nitens</i>	6	1000	300 kg N·ha ⁻¹	N	Forrester <i>et al.</i> , (2012b, 2013b)
<i>E. globulus</i> y <i>E. nitens</i>	7	1660	200 kgN·ha ⁻¹ + 300 kg P·ha ⁻¹ + 200 Ca·ha ⁻¹ , y 300 kgN·ha ⁻¹ + 400 kg P·ha ⁻¹ + 300 Ca·ha ⁻¹	N:P:Ca	Pozo, 2005
<i>E. regnans</i>	7	1167	230 y 460 kg N·ha ⁻¹	N	Messina, (1992)
<i>E. obliqua</i>	16-23	1000	300 kgN·ha ⁻¹ + 75 kgP·ha ⁻¹	N:P	La Sala, (2006)

Comúnmente se aplican altas tasas de fertilizantes químicos sobre las plantaciones de interés forestal (Tabla 1.2), las fuentes utilizadas para los distintos macroelementos en las plantas son: urea (CO(NH₂)₂) (46% N), nitrato de amonio (NH₄NO₃), nitrato de calcio (Ca(NO₃)₂), nitrato de potasio (KNO₃), fosfato monoamónico (NH₂H₂PO₄), fosfato monopotásico (KH₂PO₄), cloruro de potasio (KCl), sulfato de magnesio (MgSO₄), nitrofull (12-11-18), nitrofoska azul (12-12-17), y fosfato diamónico (18-46-0) (Messina, 1992; Monsalve *et al.*, 2009; Forrester *et al.*, 2012a; García & De La Peña, 2013). En tasas totales de 420:20, 512:171, 1200:700 de N:P aplicado (kg elemental ha⁻¹) en periodos de 6 años (Smethurst *et*

al., 2003). Algunos estudios han expuesto que la fertilización nitrogenada aumenta significativamente la biomasa aérea y radical, otorgando mejores atributos morfológicos como el crecimiento en diámetro de cuello y altura de plantas (Materan *et al.*, 2004; Monsalve *et al.*, 2009). En este sentido, el nitrógeno es un elemento esencial para las plantas, ya que forma parte de compuestos tan fundamentales como proteínas, enzimas, ácidos nucleicos y clorofila, necesitándose principalmente en los tejidos vegetales en crecimiento e interviene en la multiplicación celular y se considera factor de crecimiento y desarrollo (Urzúa, 2005; Córdova *et al.*, 2013; García *et al.*, 2010; Mayz, 2004; Carvajal & Mera, 2010; Wu *et al.*, 2005).

1.3 Biofertilizantes

Los biofertilizantes pueden definirse como productos a base de microorganismos, que viven normalmente en el suelo, aunque en poblaciones bajas, y que al incrementar sus poblaciones por medio de la inoculación artificial, son capaces de poner a disposición de las plantas, mediante su actividad biológica, una parte importante de los nutrientes que necesitan para su desarrollo, así como suministrar sustancias hormonales promotoras del crecimiento (Martínez *et al.*, 2010; Torriente, 2010). Son aplicados al suelo y/o planta con el fin de sustituir parcial o totalmente la fertilización sintética así como disminuir la contaminación generada por los agroquímicos (Armenta *et al.*, 2010). Los biofertilizantes son compuestos vitales de los sistemas sustentables, ya que constituyen medios económicamente atractivos y ecológicamente aceptables para reducir los insumos externos y mejorar la cantidad y calidad de los recursos internos, mediante la utilización de microorganismos debidamente seleccionados por su alta eficiencia e inocuidad, además pueden ser generados a partir de recursos locales y tener carácter endógeno (Chirinos *et al.*, 2006).

Para su elaboración, comúnmente se inoculan microorganismos en sustratos orgánicos, aprovechando insumos naturales como abonos, restos de descomposición de materia orgánica, excesos de cosechas, aguas residuales domésticas, estiércol animal y microorganismos como hongos y bacterias, que al

aplicarse al suelo mejoran la fijación de nutrientes en la rizósfera, producen estimulantes de crecimiento para las plantas, mejoran la estabilidad del suelo, facilitan el control biológico, biodegradan sustancias, reciclan nutrientes, favorecen la simbiosis micorrizal y desarrollan procesos de biorremediación en suelos contaminados con sustancias tóxicas (Chirinos *et al.*, 2006; Santillana, 2006; Shu *et al.*, 2007; Córdova *et al.*, 2009; Carvajal & Mera, 2010).

Los microorganismos utilizados en los biofertilizantes son clasificados dentro de dos grupos. El primer grupo incluye microorganismos que tienen la capacidad de sintetizar sustancias que promueven el crecimiento de la planta, fijando nitrógeno atmosférico, solubilizando hierro y fósforo inorgánico y mejorando la tolerancia al estrés por sequía, salinidad, metales tóxicos y exceso de pesticidas, por parte de la planta. El segundo grupo incluye microorganismos que son capaces de disminuir o prevenir los efectos de deterioro de microorganismos patógenos (Bashan & Holguin, 1998; Lucy *et al.*, 2004). En este sentido, los efectos positivos que ejercen estas bacterias en las plantas radican en que producen y segregan reguladores del crecimiento de plantas como auxinas, giberelinas y citoquininas, mejorando procesos como germinación de semillas, nutrición mineral, desarrollo de raíces, empleo del agua, fijan nitrógeno, solubilizan nutrientes, producen sideróforos y controlan fitopatógenos del suelo, entre otros (Pan *et al.*, 1999; Córdova *et al.*, 2009; Torriente, 2010).

En general, el uso de los biofertilizantes microbianos en los sistemas productivos es una alternativa viable y de gran importancia, para lograr un desarrollo agrícola ecológicamente sustentable, ya que permite una producción de bajo costo, no contamina el ambiente y mantiene la conservación del suelo desde el punto de vista de la fertilidad y biodiversidad (Sánchez & Swaminathan, 2005; Carvajal & Mera, 2010; Martínez *et al.*, 2010; Moreno y Galvis, 2013).

1.4. Rizósfera

El término rizósfera deriva de la palabra griega "*rhizo*", que significa raíz y "*sphere*" que denota el entorno de influencia de dicha raíz con características específicas, el término fue introducido por Hiltner en 1904, quien lo definió como la parte del

suelo que es influenciada por el sistema radical (Hartman, 2005). La rizósfera es el suelo adyacente a las raíces que presenta un ambiente físico, químico y biológico diferente al resto del suelo (Figura 1.4). Es la raíz quien además de las funciones de anclaje, absorción y transporte de agua y nutrimentos al sistema vascular, pone a la planta en contacto con la rizósfera, que se extiende desde la superficie de la raíz hasta dos milímetros fuera (Aguirre *et al.*, 2009).

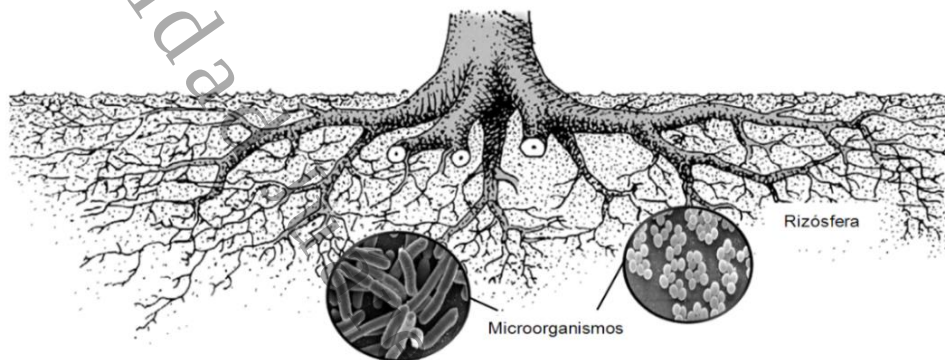


Figura 1.1. Esquema de la rizósfera de una planta.

En este pequeño espacio entre el suelo común y las raíces existe una relación de aprovechamiento mutuo entre las plantas y las bacterias, o microorganismos en general, que la rodean (Tabla 1.3). Los microorganismos obtienen de la rizósfera: fuentes de carbono agua, condiciones favorables de O_2 y mayor acceso a minerales como molibdeno, hierro, calcio, potasio y magnesio (Loredo *et al.*, 2007). En esta región sucede además, competencia, mutualismo, predación y parasitismo que ayudan a la estabilidad de los sistemas de producción agropecuaria. El grupo de microorganismos y otros agentes que se encuentran en la rizósfera incluyen bacterias, hongos, nematodos, protozoos, algas y micro-artrópodos (Sánchez, 2005; Sarabia *et al.*, 2010).

La rizósfera no es una zona uniforme, es posible diferenciar tres regiones: rizósfera, rizoplano y endorrizósfera. La rizósfera es el volumen de suelo adyacente al sistema de raíces de las plantas, es influenciado por los exudados de raíz, en ella se desarrollan una población microbiana muy superior a la del resto del suelo, la zona rizosférica es todo el suelo bajo su dominio. La segunda zona, el rizoplano le sigue a la rizósfera, es la raíz sin suelo adherido, en ella se establecen principalmente microorganismos que establecen asociación simbiótica y mutualista

con la planta. Enseguida se halla la endorrizósfera que incluye el tejido cortical, en ella es posible encontrar tres clases de organismos: los que conviven en simbiosis mutualista con la planta, los que parasitan el tejido vegetal y finalmente los que habitan los tejidos muertos de la raíz (Sánchez, 2005; Sánchez, 2007).

Tabla 1.3. Compuestos orgánicos y enzimas liberados por las plantas en los exudados radiculares y su función en la rizósfera (Medina, 2012).

Clase de compuestos	Componentes	Funciones
Azúcares	Arabinosa, desoxirribosa, fructuosa, galactosa, glucosa, maltosa, oligosacáridos, rafinosa, ramnosa, ribosa, sacarosa, xilosa, manitol, polisacáridos complejos.	Lubricación, protección de la planta contra toxinas; quimioatrayentes, estimulación del crecimiento microbiano.
Aminoácidos y amidas	Los 20 aminoácidos proteinogénicos, ácido γ -aminobutírico, cistationina, cistina, homoserina, ácido mugénico, ornitina, fitosideróforos, betaína, estaquidrina.	Inhibición de los nematodos y el crecimiento de las raíces; estimulación del crecimiento microbiano, quimioatrayentes, osmoprotectores, secuestrantes de hierro.
Ácidos alifáticos	Acético, acetónico, aconítico, aldónico, butírico, cítrico, eritrónico, fórmico, fumárico, glucónico, glutárico, glicólico, isocítrico, láctico, maléico, málico, malónico, oxálico, oxalacético, oxaloglutárico, piscídico, propiónico, pirúvico, siquímico, succínico, tartárico, tetrónico, valérico.	Regulación del crecimiento vegetal; quimioatrayentes; estimulación del crecimiento microbiano.
Ácidos aromáticos	p-hidroxibenzóico, cafeico, p-cumárico, ferúlico, gálico, gentísico, protocatéquico, sinápico, ácido siríngico.	Regulación del crecimiento vegetal; quimioatrayentes.
Fenoles	Flavonoides, flavonas, flavanonas, antocianinas, isoflavonoides, acetosiringona.	Regulación del crecimiento vegetal, interacciones alelopáticas; defensa de la planta; fitoalexinas; quimioatrayentes; inicio de las interacciones simbióticas leguminosa-rizobio, micorrízica y actinorrízica; estimulación del crecimiento microbiano; estimulación de la degradación xenobiótica bacteriana.
Ácidos grasos	Linoleico, linolénico, oleico, ácido palmítico, ácido esteárico.	Regulación del crecimiento vegetal.
Vitaminas	Ácido p-aminobenzoico, biotina, colina, ácido n-metionilnicotínico, niacina, pantotenato, piridoxina, riboflavina, tiamina.	Estimulación del crecimiento microbiano.
Esteroles	Campesterol, colesterol, sitosterol, estigmasterol.	Regulación del crecimiento vegetal.
Enzimas y proteínas	Amilasas, invertasas, fosfatasa, poligalacturonasas, proteasas, hidrolasas, lectinas.	Defensa de la planta, degradación de factores Nod.
Hormonas	Auxinas, etileno y su precursor 1-aminociclopropano-1-carboxílico (ACC), putrescina, jasmonato, ácido salicílico.	Regulación del crecimiento vegetal
Otros	Compuestos no identificados miméticos de las	Regulación del crecimiento vegetal;

acil-homoserina lactonas, saponina, escopoletina, especies reactivas del oxígeno, nucleótidos, calistegina, trigonelina, xantonas, estrigolactonas.	defensa de plantas; adhesión microbiana; estimulación del crecimiento microbiano; inicio de las interacciones micorrícicas.
---	---

Los microorganismos que se establecen en cada una de estas regiones (Tabla 1.4), se han especializado en estos hábitats a través de procesos coevolutivos y varían dependiendo de las especies de plantas, edad, condiciones sanitarias y ambientales, entre otros factores (Sánchez, 2005; Sánchez, 2007).

Tabla 1.4. Algunos microorganismos que habitan las diferentes regiones de la rizósfera.

Rizósfera	Rizoplasma	Endorrizosfera
<i>Azotobacter</i>	<i>Beijerinckia</i>	Hongos que forman micorriza
<i>Bacillus</i>	<i>Azospirillum</i>	<i>Rizobios</i>
<i>Pseudomonas</i>	<i>Bdellovibrio</i>	Cianobacterias simbiotes
Lombrices, colémbolos, ácaros		Actinomicetos fijadores de N ₂
Protozoos		Bacterias parásitas
Algas		Protozoos parásitos
Actinomicetos		Nematodos endoparásitos
Nematodos		Hongos parásitos
Hongos saprofitos		Bacterias saprófitas
Bacterias saprófitas		Endófitos en general
<i>Rizobios</i> y otros endo		
B. amonificantes y nitrificantes		

Las bacterias que colonizan la raíz y su zona de influencia son denominadas “rizobacterias”. Las rizobacterias beneficiosas conocidas en la literatura con el acrónimo PGPR, por sus siglas en inglés (Plant Growth Promoting Rhizobacteria), desempeñan funciones claves para la planta tales como: control biológico de los patógenos mediante efectos antagonistas o de incubación de resistencia sistemática, incremento de la biodisponibilidad de elementos minerales como por ejemplo la solubilización de fosfatos, fijación de nitrógeno, o la fitoestimulación al propiciar la emergencia o el enraizamiento (Franco, 2008).

Los microorganismos de la rizósfera contribuyen al crecimiento vegetal aumentando la disponibilidad de nutrientes limitantes como el fósforo y el nitrógeno, y a su vez, la composición y actividad de la comunidad bacteriana, está fuertemente influenciada por el tipo de vegetación presente en el suelo (Thomson *et al.*, 2010; Silvestrini *et al.*, 2012). Los géneros *Azospirillum*, *Azotobacter*, *Pseudomonas*, *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Alcaligenes*, *Arthrobacter*, *Burkholderia*,

Bacillus y *Serratia* han sido reportados como bacterias promotoras del crecimiento vegetal (Saharan & Nehra 2011).

1.5 Bacterias promotoras del crecimiento vegetal (PGPR)

En el suelo existe gran diversidad de microorganismos benéficos para el desarrollo y producción de las plantas, entre los que se encuentran las rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal PGPR por su acrónimo en inglés “Plant Growth Promoting Rhizobacteria”, son microorganismos de vida libre que viven en la rizósfera o rizoplaneo, en estrecho contacto entre raíces, suelo y microorganismos (Riveros, 2010; Gómez *et al.*, 2012). Las PGPR realizan funciones, tales como: estimular la síntesis de sustancias reguladoras del crecimiento, fijar nitrógeno, solubilizar nutrientes, producir sideróforos y controlar los fitopatógenos del suelo. Las PGPR, una vez inoculadas a las semillas, inducen la germinación y colonizan la raíz, y transforman los exudados radicales en sustancias promotoras del crecimiento vegetal, mediante un tipo de estimulación muy similar a las fitohormonas comerciales. En este proceso ocurre la proliferación de pelos radicales, el incremento en la absorción mineral de nutrientes (nitrógeno, fósforo y hierro), entre otros (Medina, 2012). Los géneros de PGPR mayormente estudiados por su uso con fines agrícolas son: *Azospirillum*, *Azotobacter*, *Rhizobium*, *Serratia*, *Klebsiella*, *Beijerinckii*, *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Burkholderia*, *Anabena*, *Nostoc* y *Arthrobacter* (Riveros, 2010).

Las PGPR ejercen efectos benéficos en las plantas a través mecanismos directos e indirectos para la promoción del crecimiento vegetal (Gómez *et al.*, 2012). La promoción directa ocurre cuando las bacterias sintetizan metabolitos que facilitan a las plantas la toma de ciertos nutrientes a partir del ambiente; mientras que el mecanismo indirecto se lleva a cabo cuando las PGPR disminuyen o previenen el efecto letal de fitopatógenos mediante control biológico (Glick, 1995; Glick *et al.*, 1999). Esta clasificación no está completamente diferenciada debido a la gran cantidad de interrelaciones entre los dos mecanismos (Camelo *et al.*, 2011).

La actividad de los microorganismos promotores de crecimiento vegetal en general se inicia con mecanismos de quimiotaxis que están relacionados con la presencia

de flagelos, quimiorreceptores y sistemas de regulación codificados genéticamente (Camelo *et al.*, 2011). Estos factores tienen gran importancia sobre la habilidad de colonizar la rizósfera y mantener la comunicación entre las células de la raíz con los microorganismos presentes en el suelo (Mavrodi *et al.*, 2006). Las bacterias capaces de interactuar con las raíces de las plantas son atraídas por sustancias excretadas por la raíz, que ocasionan el movimiento de la bacteria hacia el rizoplasma de la planta y de esta forma dar inicio a una relación de beneficio mutuo (Camelo *et al.*, 2011).

Dentro de las principales características de las PGPR, encontramos que:

- Tienen una elevada densidad poblacional en la rizósfera después de su inoculación en las plantas.
- Poseen la capacidad de colonización efectiva en la superficie de la raíz y, como consecuencia, puedan influir positivamente en el crecimiento de la planta.
- Pueden controlar de manera natural y eficiente a otros microorganismos del suelo capaces de enfermar a las plantas.
- Constituyen excelentes alternativas biotecnológicas para mejorar el rendimiento de cultivos de importancia agronómica.

Gracias a estas cualidades, las PGPR han sido utilizadas en el desarrollo de biofertilizantes y se postulan como alternativa prometedora para reducir el uso de abonos nitrogenados de síntesis química (Estrada *et al.*, 2009; Camelo *et al.*, 2011).

1.5.1 Mecanismos de acción de las PGPR

Las PGPR pueden actuar sobre la planta de maneras diferentes, y éstas reciben diversas clasificaciones. Los mecanismos de acción de las PGPR pueden clasificarse en directos e indirectos, y cada uno de ellos puede actuar de manera independiente (Camelo *et al.*, 2011; Gómez *et al.*, 2012).

1.5.1.1 Mecanismos de acción directa

Los mecanismos de acción directa, empleados por bacterias, son muy diversos y en algunos casos poco estudiados, sin embargo, se pueden diferenciar claramente dos procesos esenciales: el primero consiste en la producción de sustancias orgánicas, producto del metabolismo secundario de las bacterias, que son capaces de promover respuestas fisiológicas específicas en las células vegetales. El segundo mecanismo se puede encontrar en la intervención directa de los microorganismos en los ciclos biogeoquímicos, en los cuales pueden hacer disponibles compuestos orgánicos e inorgánicos que son aprovechados por las plantas (Camelo *et al.*, 2011). A este grupo pertenecen aquellos metabolitos producidos por la bacteria, capaces de estimular el crecimiento vegetal. Totalmente independientes de la población microbiana edáfica y del soporte edáfico. Los mecanismos directos son (Celis & Gallardo, 2008):

- Fijación de nitrógeno de forma asociativa.
- Producción de reguladores de crecimiento vegetal como auxinas, giberelinas y citoquininas, entre otras.
- Sulubilización de minerales.
- Inhibición de síntesis de etileno.
- Aumento en la permeabilidad de la raíz.

El mecanismo de acción directo de las PGPR por excelencia es la producción de reguladores de crecimiento vegetal. Las sustancias promotoras del crecimiento vegetal, son de carácter orgánico que activan varias repuestas en la célula vegetal, a nivel bioquímico, fisiológico y morfológico. Entre las bacterias con reconocida actividad como productoras de reguladores de crecimiento se encuentran los géneros *Azotobacter* sp, *Pseudomonas* sp, *Bacillus* sp, *Azospirillum* sp, *Pantoea agglomerans*, *Herbaspirillum* sp, *Gluconacetobacter diazotrophicus* y *Burkholderia* sp (Obando *et al.*, 2010; Camelo *et al.*, 2011). Los cuales al penetrar la raíz producen auxinas, giberelinas, citoquininas y fijan nitrógeno, que promueven el crecimiento de las raíces y la proliferación de pelos radicales, mejorando la absorción de agua y minerales del suelo y con ello el

mejor y mayor desarrollo de las plantas, lo que las convierte en excelentes biofertilizantes (Borda *et al.*, 2009; Rivera *et al.*, 2010).

Auxinas: El ácido indol acético (AIA) es la auxina más estudiada debido a su clara acción en la formación de dominios apicales, diferenciación vascular y en el desarrollo de órganos (Tsavkelova *et al.*, 2006; Obando *et al.*, 2010).

Gibelerinas: Esta fitohormona es capaz de incrementar el crecimiento de los tallos, interrumpir el periodo de latencia de las semillas para germinar. Además es capaz de inducir la brotación de yemas, así como, promover la floración y el desarrollo de los frutos (Camelo *et al.*, 2011).

Citocinas: Estos compuestos químicos son capaces de regular la citoquinesis de las células vegetales. La biosíntesis de esta fitohormona en plantas ha sido difícil de identificar, sin embargo, se cree que el principal sitio de producción es el tejido radicular, moviéndose desde éste a los tejidos vegetales que lo requieran (Camelo *et al.*, 2011).

1.5.1.2 Mecanismos de acción indirecta

Los mecanismos indirectos, ocurren por metabolitos producidos por las bacterias promotoras de desarrollo vegetal (PGPR) que funcionan como determinantes antagónicos, que involucran aspectos de control biológico. Estos suprimen e inhiben el crecimiento de fitopatógenos perjudiciales para su desarrollo, esto es, a través de la producción de antibióticos y sideróforos (Rao *et al.*, 2000; Voinnet, 2005). Los principales mecanismos indirectos son:

- Producción de sideróforos.
- Competencia y desplazamiento.
- Producción de antibióticos.
- Producción de enzimas líticas.

El hierro es un elemento esencial para el crecimiento de los organismos, las plantas lo obtienen del suelo y cuando la disposición del nutriente es limitada los habitantes de la rizósfera entran en competencia por adquirirlo (De Weger, 1998). En la competencia por el hierro, las PGPR excretan compuestos al medio en condiciones de escasez de este mineral, secuestrándolo, con lo cual se inhibe el

crecimiento de patógenos en la rizósfera, ya que convierten al hierro en factor limitante. Las PGPR producen compuestos de bajo peso molecular llamados sideróforos para obtener competentemente este mineral del suelo (Whippis, 2001). Los sideróforos son compuestos que desempeñan la función de solubilizar específicamente el hierro e incorporarlo al metabolismo celular, químicamente, se consideran compuestos ligantes o quelantes a hierro que funcionan de forma general uniéndose covalentemente a hierro sin generar cambios en el estado de oxidación.

Otro mecanismo de acción indirecta es la antibiosis, a través del cual se inhibe o destruye a un microorganismo por los productos metabólicos de otros, que incluyen antibióticos, enzimas líticas (glucanasas, quitinasas) y enzimas detoxificadoras. Algunas bacterias pueden hidrolizar moléculas producidas por patógenos como *Pseudomonas cepacia* y *P. solanacearum*, son capaces de hidrolizar el ácido fusárico, liberar β 1,3-glucanasa inhibiendo el desarrollo de la pared fúngica de hongos fitopatógenos como *Phytophthora blight* y *Rhizoctonia solani* (Loon, 2007).

1.6 Fijación de nitrógeno

El nitrógeno (N) es un elemento esencial para las plantas, ya que forma parte de compuestos tan fundamentales como proteínas, enzimas, ácidos nucleicos y clorofila, necesitándose principalmente en los tejidos vegetales en crecimiento e interviene en la multiplicación celular y se considera factor de crecimiento y desarrollo (Mayz, 2004; Urzúa, 2005; Wu *et al.*, 2005; Carvajal & Mera, 2010; García *et al.*, 2010; Córdova *et al.*, 2013).

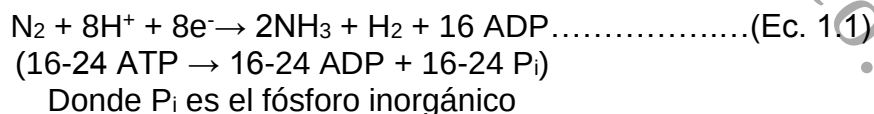
La fijación de nitrógeno se lleva a cabo por tres vías: 1) Fijación industrial, en el cual se estima que se fijan aproximadamente 100 millones de toneladas de nitrógeno por año y la mayoría es para producir fertilizantes nitrogenados, 2) Descargas eléctricas, que favorecen que el oxígeno forme óxidos de nitrógeno (NO , NO_3), este proceso aporta 10% de la fijación total de nitrógeno; sin embargo, al ser un proceso natural no es controlable por el hombre y 3) Fijación biológica, llevada a cabo por organismos procariontes que fijan 175 millones de toneladas de nitrógeno por año (Rodríguez, 2008). Algunas investigaciones sugieren que la

fijación biológica de nitrógeno de forma asimbiótica, puede ser dominante en los ecosistemas de pastizales templados con tasas que van desde 0.1 a 21 kg N ha⁻¹ año⁻¹ con una media de 4.7 kg N ha⁻¹ año⁻¹ (Reed *et al.*, 2011).

La vía normal de ingreso de nitrógeno a las plantas proviene del suelo; sin embargo, el 90-95 % del nitrógeno total del suelo se encuentra en forma orgánica, de modo que no es directamente asimilable por las plantas, para ser absorbido, se debe encontrar mineralizado (García *et al.*, 2010; Reed *et al.*, 2011). A su vez, el nitrógeno mineral del suelo, se encuentra en forma de amonio, NH₄⁺, y de nitrato, NO₃⁻. Ambas formas son asimilables por las plantas, pero la mayor parte del nitrógeno es absorbido en forma de nitrato (Urzúa, 2005; García *et al.*, 2010; Keuter *et al.* 2014).

El nitrógeno se encuentra principalmente en la atmósfera, donde constituye aproximadamente el 80%, existiendo en la forma N≡N; sin embargo, el N₂, debido al triple enlace entre los dos átomos de nitrógeno, que hace a la molécula casi inerte, no puede ser aprovechado por la mayoría de las formas vivientes, sino por un pequeño grupo de microorganismos altamente especializados, que incluyen algas, bacterias y actinomicetos (Mayz, 2004; Carvajal & Mera, 2010).

Para ser utilizado en el crecimiento, éste debe ser primero reducido y luego fijado en la forma de iones amonio (NH₄⁺) o nitrato (NO₃⁻) (Mayz 2004; García *et al.*, 2010; Keuter *et al.*, 2014). El proceso a través del cual esos microorganismos reducen el nitrógeno hasta una forma utilizable es conocido como Fijación Biológica de Nitrógeno (FBN). El proceso puede ser llevado a cabo por los microorganismos en vida libre o en simbiosis con plantas, y el mismo no sólo permite usar el nitrógeno atmosférico sino también revertir o reducir la degradación del suelo. En la fijación del nitrógeno, el N₂ se reduce a amoniaco, que se convierte en una forma orgánica. La reducción está catalizada por el complejo enzimático nitrogenasa, presente en los organismos fijadores, el cual cataliza la conversión del N₂ a NH₃ bajo la reacción global de la Ecuación 1.1.



Aunque solo se necesitan seis electrones para reducir el N_2 a dos NH_3 , en el proceso se consumen en realidad ocho electrones, de los que dos se pierden como H_2 por cada mol de N_2 reducido. La actividad del complejo enzimático puede ser mermada por el oxígeno, de tal manera que los organismos fijadores poseen mecanismos (eliminación rápida de O_2 por la respiración; producción de capas mucosas que retrasan el O_2 ; compartimentación de la nitrogenasa) que les permiten mantener bajas concentraciones de éste a fin de mantener la enzima funcionando (Baca *et al.*, 2000; Urzúa, 2005; Madigan *et al.*, 2012; Unkovich & Baldock, 2008; Seefeldt *et al.*, 2012; Cherkasov *et al.*, 2015; Markov *et al.*, 2015).

1.6.1 Microorganismos fijadores de nitrógeno

La utilización del N_2 (nitrógeno gaseoso) como fuente de nitrógeno celular se llama fijación del nitrógeno. La capacidad de fijar el N_2 libera al organismo de la dependencia de determinadas moléculas nitrogenadas, como el amoníaco o el nitrato. Como en los sistemas microbianos existe una gran demanda de nitrógeno fijado, la capacidad de fijar N_2 confiere una ventaja ecológica significativa a las células capaces de realizar el proceso. Además, algunas formas de fijación del nitrógeno son de gran importancia agrícola, al sostener las necesidades de nitrógeno de los cultivos clave (Madigan *et al.*, 2012).

Los microorganismos que intervienen en la fijación biológica de nitrógeno se clasifican en dos grupos: los microorganismos que fijan nitrógeno en forma no simbiótica o de vida libre, que no requieren un hospedador para llevar a cabo el proceso y que proporcionan al medio compuestos nitrogenados como amonio que es aprovechado por los vegetales (Tabla 1.5), y los microorganismos que fijan el nitrógeno en forma simbiótica con plantas leguminosas y no leguminosas, estos microorganismos sólo fijan nitrógeno en asociación con ciertas plantas (Lara *et al.*, 2007; Madigan *et al.*, 2012; Armenta *et al.*, 2010).

Tabla 1.5. Géneros de bacterias fijadoras de nitrógeno de vida libre (Madigan *et al.*, 2012).

Género	Grupo filogenético	Características
<i>Azotobacter</i>	Gammaproteobacterias	Bacilos grandes; producen quistes; principalmente aislados en suelos neutros o alcalinos.
<i>Azomonas</i>	Gammaproteobacteria	Bacilos grandes, no producen quistes; principalmente acuáticas.

<i>Azospirillum</i>	Alfaproteobacteria	Bacilos microaerófilicos; asociados a plantas.
<i>Beijerinckia</i>	Alfaproteobacteria	Bacilo en forma de pera y largos cuerpos lipídicos grandes en cada extremo; produce secreciones mucosas en gran cantidad; habitan suelos ácidos.
<i>Azoarcus</i>	Betaproteobacteria	Pequeñas células curvadas; no producen quistes.
<i>Azovibrio</i>	Betaproteobacteria	Células curvadas muy finas; no producen quistes.
<i>Azospira</i>	Betaproteobacteria	Bacilos muy finos o vibrios; no producen quistes.
<i>Azonexus</i>	Betaproteobacteria	Células enrolladas de hasta 50 µm de largo; no producen quistes.
<i>Derxia</i>	Betaproteobacteria	Bacilos; forman colonias abundantes y arrugadas.

Todos los microorganismos que convierten el nitrógeno en amoníaco lo hacen gracias a la actividad del complejo enzimático llamado nitrogenasa que está constituido por dos proteínas diferentes: la *dinitrogenasa* y la *dinitrogenasa-reductasa* (Madigan *et al.*, 2012).

Diversos organismos que habitan en el suelo son capaces de fijar N₂ aeróbicamente. Las principales bacterias de vida libre fijadoras de nitrógeno de vida libre que se han estudiado incluyen *Azospirillum* sp, *Azotobacter* sp. Los cultivos en donde ha sido más estudiado este proceso de fijación de nitrógeno son: Pasto guinea, mijo, sorgo, haba, trigo, cebada, arroz, maíz, garbanzos, avena, girasol, mostaza, caña de azúcar, pastos tropicales forrajeros (Lucy *et al.*, 2004; Armenta *et al.*, 2010). La mayoría de los estudios exponen la capacidad biofertilizante de *Azospirillum* sp y *Azotobacter* sp sobre cereales, flores, cítricos, gramíneas y leguminosas. Sin embargo, se han hecho diferentes experimentos de inoculaciones con bacterias fijadoras de nitrógeno sobre especies arbóreas y forestales, que han dado resultados satisfactorios principalmente en la germinación, crecimiento de la planta y enraizamiento (Tabla 1.6). Por lo anterior, estas bacterias pueden contribuir sustancialmente a que los agricultores economícen en fertilizantes nitrogenados conservando el medio ambiente, pues la actividad y eficiencia de estos microorganismos de vida libre con capacidad de fijar nitrógeno, han demostrado un extraordinario potencial para la explotación agrícola (Lara *et al.*, 2007).

Tabla 1.6. Inoculaciones efectivas en variables de crecimiento de especies arbóreas.

Cultivo	Bacterias	Hongos	Parámetro	Autores
Espino (<i>Crataegus</i> <i>pseudoheterophylla</i>)	<i>Azotobacter chroococcum</i> , <i>Azospirillum lipoferum</i> , <i>Pseudomonas fluorescens</i> , <i>Bacillus subtilis</i>	---	Germinación	Fatemeh <i>et al.</i> , 2014

Cultivo	Bacterias	Hongos	Parámetro	Autores
Fresno blanco americano (<i>Fraxinus americana</i>)	PGPR (CGMCC No. 5318)	---	Biopotenciaron el crecimiento vegetal la absorción de nutrientes.	Liu <i>et al.</i> , 2013
Cafeto arábigo (<i>Coffea arabica</i>)	<i>Azospirillum brasilense</i>	<i>Glomus sp</i>	Número de hojas, diámetro del tallo y biomasa.	Aguirre <i>et al.</i> , 2011
Casuarina (<i>Casuarina spp</i>)	<i>Frankia</i>	---	Crecimiento.	Sayed, 2011
Pino (<i>Pinus patula</i>)	<i>Pseudomonas sp</i> , <i>Bacillus macerans</i> , <i>Enterobacter agglomerans</i> , <i>Azotobacter chroococcum</i> , <i>B. firmus</i> , <i>B. mycoides</i> , <i>B. stearothermophilus</i> , <i>B. subtilis</i> , <i>B. circulans</i> , <i>Brevibacillus brevis</i> , <i>P. lautus</i> , <i>S. maltophilia</i>	<i>Suillus luteus</i>	Altura, peso seco, contenido de N suelo y foliar.	Orozco & Martínez, 2009
Eucalipto (<i>Eucalyptus globulus</i>)	---	---	Incremento en la biomasa de raíces.	Díaz <i>et al.</i> , 2009
Melina (<i>Gmelina arborea</i>)	<i>Azospirillum brasilense</i>	<i>Glomus sp</i>	Germinación y crecimiento.	Zambrano & Díaz, 2008
Eucalipto (<i>Eucalyptus urophylla</i>)	---	<i>Scleroderma</i>	Aumento de la altura y de biomasa seca total.	Chen <i>et al.</i> , 2006
Algarrobo blanco (<i>Prosopis alba</i>)	<i>Azospirillum spp</i> , <i>Agrobacterium rhizogenes</i> , <i>Pseudomonas aurantiaca</i>	---	Acelerar el crecimiento de raíces, estimularon el enraizamiento.	Felker <i>et al.</i> , 2005
Eucalipto (<i>Eucalyptus globulus</i> Labill)	----	<i>L. fraterna</i> <i>H. carneum</i> <i>H. albus</i> <i>S. areolatum</i> <i>P. tinctorius</i> <i>Acaulospora</i> <i>Scrobiculata</i> , <i>Glomus intraradices</i>	Aumento del diámetro de tallo y del peso de biomasa aérea seca.	Mason <i>et al.</i> , 2000
Eucalipto (<i>Eucalyptus hybrid</i>)	<i>Pseudomona PRS9</i>	<i>Laccaria bicolor</i> <i>Laccaria laccata</i> <i>Laccaria fraterna</i> <i>Laccaria masonii</i>	Crecimiento vegetal y desarrollo de raíces.	Sastry <i>et al.</i> , 2000
Eucalipto (<i>Eucalyptus diversicolor</i> F. Muell)	<i>Pseudomonas fluorescens</i> y <i>Bacillus subtilis</i>	---	Crecimiento vegetal.	Dunstan <i>et al.</i> , 1998
Roble (<i>Quercus ithaburensis</i>)	<i>Azospirillum brasilense</i>	---	Germinación, incremento de peso seco y crecimiento de raíces.	Zaady & Perevolotskyb, 1995
Casuarina (<i>Casuarina cunninghamiana</i>)	<i>Azospirillum brasilense</i> <i>Frankia</i>	---	Aumento de biomasa aérea y radical, mayor contenido de N.	Rodríguez <i>et al.</i> , 1991

1.6.2.1 Bacterias del género *Azospirillum* sp

Azospirillum sp, pertenece al grupo filogenético α - subclase de las proteobacterias, es una bacteria Gram negativa, de vida libre, fijadora de nitrógeno y asociada a la rizósfera de plantas (Madigan *et al.*, 2012). Se han descrito siete especies dentro del género: *A. lipoferum*, *A. brasilense*, *A. amazonense*, *A. halopraefens*, *A. irakense*, *A. doebereinearae* y *A. largomibile* (Collados, 2006; Garrity *et al.*, 2006).

Tiene un metabolismo carbonado y nitrogenado muy versátil, lo que le permite adaptarse y establecerse en el competitivo entorno rizosférico.

Como fuentes nitrogenadas, *Azospirillum* sp puede utilizar un amplio rango de sustratos, amonio, nitrato, nitrito, aminoácidos y nitrógeno molecular. En condiciones desfavorables, tales como desecación y carencia de nutrientes, puede enquistarse, recubriéndose de una capa de polisacáridos produciendo una acumulación de gránulos de β -hidroxibutirato, que sirven a la bacteria de reserva de fuente carbonada. Es una bacteria móvil, que muestra gran variabilidad en el número y posición de sus flagelos. La presencia de flagelos proporciona la movilidad necesaria para dirigirse hacia lugares donde la presencia de nutrientes sea más favorable. Presenta quimiotaxis positiva hacia ácidos orgánicos, azúcares, aminoácidos, compuestos aromáticos y hacia exudados radicales. Este género además tiene tendencia a dirigirse hacia lugares donde la concentración de oxígeno sea la adecuada (denominada aerotaxis). Este comportamiento permite a la bacteria dirigirse hacia un nicho ecológico apropiado en la rizósfera para producir la fijación biológica del nitrógeno y sustancias estimuladoras del crecimiento (auxinas, citoquinas y giberelinas) (Collados, 2006; Garrity *et al.*, 2006; De Bashan *et al.*, 2007; Madigan *et al.*, 2012; Villa *et al.*, 2014). La fitohormona más importante producida por *Azospirillum* sp es la auxina ácido indol-3-acético, se ha comprobado que las plantas presentan cambios morfológicos en las raíces, así como también una mejor absorción de minerales después de inocularse con *Azospirillum* sp; estos cambios se atribuyen a la liberación de AIA de esta bacteria (Steenhoudt & Vanderleyden, 2000; Obando *et al.*, 2010; Rangel *et al.*, 2014).

La capacidad de producir estas sustancias estimuladoras del crecimiento es considerada como uno de los principales mecanismos de acción de *Azospirillum* sp, ya que estimula la longitud, la densidad de las raíces laterales y el incremento del área superficial de las raíces, favoreciendo la mayor absorción de agua y nutrientes minerales que ayudan al rápido crecimiento de las plantas (Dobbelaere, *et al.*, 2001; Bashan *et al.*, 2004; Bashan & De Bashan, 2010). Distintos experimentos de inoculación en campo con *Azospirillum* sp han demostrado que estas bacterias son capaces de promover el rendimiento de las cosechas en

diferentes suelos y regiones climáticas (Collado, 2006; López *et al.*, 2008; Córdova *et al.*, 2009; Obando *et al.*, 2010; Rivera *et al.*, 2010; Becerra *et al.*, 2014; Rangel *et al.*, 2014; Villa *et al.*, 2014) (Tabla 1.6).

1.6.2.2 Bacterias del género *Azotobacter* sp

Azotobacter sp, pertenece al grupo filogenético y subclase de las proteobacterias, es una bacteria Gram negativa, de vida libre, fijadora de nitrógeno y asociada a la rizósfera de plantas. La primera especie del género fue descubierta por el microbiólogo holandés M. W. Beijerinck a principios del siglo XX, utilizando cultivos de enriquecimiento aeróbicos con N₂ atmosférico como fuente de nitrógeno (Madigan *et al.*, 2012). Se han descrito siete especies dentro del género: *A. chroococcum*, *A. vinelandii*, *A. beijerinckii*, *A. paspali*, *A. armeniacus*, *A. nigricans* y *A. salinestris* (Garrity *et al.*, 2006).

El género *Azotobacter* sp comprende un grupo de grandes células ovoides de 1.5-2.0 µm de diámetro. El pleomorfismo es común en este género, variando su morfología desde bacilos hasta células en forma de cocos (Garrity *et al.*, 2006; Madigan *et al.*, 2012). Se producen individualmente, en parejas, o grupos irregulares, y a veces en cadenas de longitud variable. Son aerobios, pero algunos pueden vivir en tensiones bajas de oxígeno y su movilidad se debe a flagelos peritricos. *Azotobacter* sp tiene formas de resistencia denominadas cistos, los cistos tienen un índice de respiración muy bajo y son resistentes a la desecación, desintegración mecánica y radiaciones ultravioleta e ionizantes (Madigan *et al.*, 2012).

Estas bacterias fijan al menos 10 mg de N₂ por gramo de carbohidrato consumido, utilizan nitrato y sales de amonio y ciertos aminoácidos como fuentes de nitrógeno y el rango de pH en el que crecen en presencia de nitrógeno combinado es 4.8-8.5 (Garrity *et al.*, 2006; Jiménez, 2007; Celis & Gallardo, 2008). Bioquímicamente son catalasa y oxidasa positivo, reducen el nitrato, producen sulfuro de hidrógeno e hidrolizan almidón, producen promotores de crecimiento (como las fitohormonas: gibberelinas, auxinas y citoquininas) y la enzima 1-aminociclopropano-1-ácido carboxílico (ACC)-deaminasa, sustancias que favorecen el desarrollo del sistema

radical y el crecimiento de las plantas (Santana & Vásquez, 2002; Dobbelaere *et al.*, 2003; Obando *et al.*, 2010). Al igual que los demás fijadores de nitrógeno, *Azotobacter* sp es quimiheterótrofo, utiliza como fuente de carbono y energía una gran cantidad de ácidos orgánicos, azúcares o sus derivados alcohólicos como el manitol, que es el sustrato más empleado para aislarlos y cultivarlos, dentro de las sustancias que utilizan como fuente de carbono y energía se encuentra la fructuosa, glucosa, sucrosa, acetato, fumarato, piruvato, succinato, acetilmetilcarbinol y α -oxoglutarato (Garrity *et al.*, 2006).

Los microorganismos diazótrofos y productores de auxina pertenecientes al género *Azotobacter* sp, son de gran importancia por el potencial que representan para los cultivos; investigaciones realizadas al respecto, han demostrado que sus características les permiten aumentar el rendimiento en las cosechas, mejorar características morfológicas de las plantas, reducir ciclos, mejor aprovechamiento de nutrimentos y agua, disminuir el uso desmedido de fertilizantes minerales y productos químicos y, por consiguiente, reducir la contaminación ambiental (Wu *et al.*, 2005; Reyes & Valery, 2007; Reyes *et al.*, 2008; Borda *et al.*, 2009; Córdova *et al.*, 2009; Egas, 2010; Adriano *et al.*, 2011; León *et al.*, 2012) (Tabla 1.6).

CAPÍTULO II. MATERIALES Y MÉTODO

La investigación se desarrolló en seis etapas: Etapa I. Trabajo de campo; Etapa II. Caracterización fisicoquímica y microbiológica del suelo del cultivo de eucalipto; Etapa III. Selección de bacterias fijadoras de nitrógeno; Etapa IV. Establecimiento del diseño experimental para la producción de biofertilizantes; Etapa V. Estudio del efecto de biofertilizantes sobre plántulas de eucalipto en invernadero; Etapa VI. Análisis estadístico de las variables respuesta (Figura 2.1).

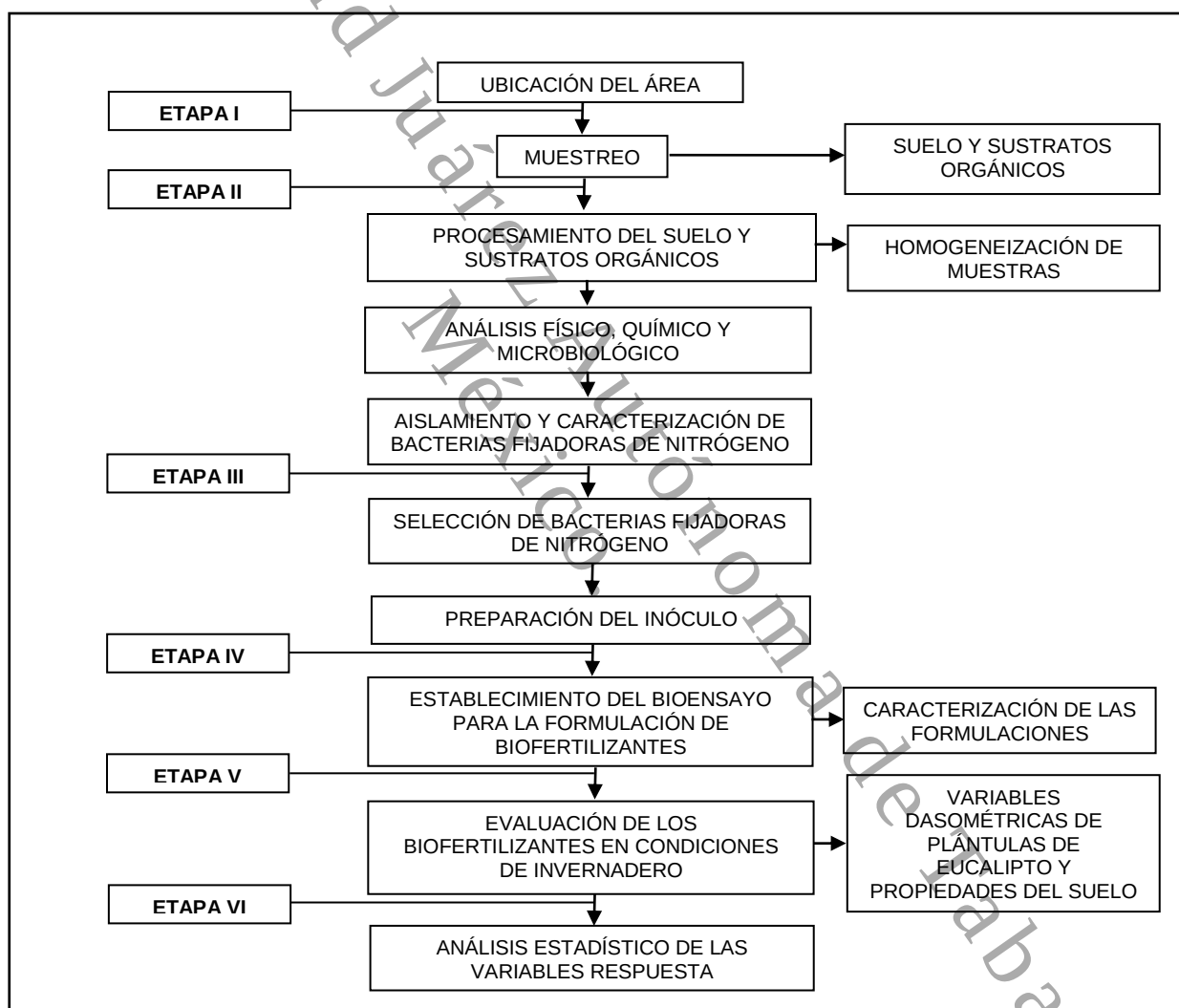


Figura 2.1. Esquema que sintetiza las etapas de la investigación.

2.1 ETAPA I. Trabajo de campo

2.1.1 Descripción del área de estudio

El muestreo se realizó en plantaciones forestales de *E. grandis*, de la empresa Forestaciones Operativas Mexicanas, S.A. de C.V. (FOMEX), ubicada en la carretera Huimanguillo-Francisco Rueda, en el municipio de Huimanguillo, Tabasco, México, en las coordenadas geográficas 17°47'19" de latitud norte y 93°37'52" de longitud oeste (Figura 2.2 y 2.3) (INEGI, 2015a). El clima es cálido húmedo con abundantes lluvias en verano (59.89%) y cálido húmedo con lluvias todo el año (40.11%) (INEGI, 2008).

Esta localidad se encuentra en la zona de lomeríos del estado de Tabasco en lo que se conoce como "la sabana de Huimanguillo". Los lomeríos tienen en común la característica de ser suelos muy frágiles a la erosión, por la pendiente que presentan, la textura gruesa superficial y la poca agregación del suelo, de ahí que su uso y manejo ha causado grandes problemas de erosión superficial. En particular, los suelos de la sabana de Huimanguillo, son ácidos con bajos niveles de fertilidad nativa, que no favorece el desarrollo de muchos cultivos, además, presentan altos contenidos de arcilla del tipo 1:1 en el horizonte argílico y lento drenaje interno. Estos suelos son reconocidos principalmente dentro de los grupos mayores Acrisoles y Cambisoles, es decir, suelos de alto a mediano desarrollo (Palma *et al.*, 2006; INEGI, 2008).

2.1.2 Selección de sitio de muestreo

El área forestal de la empresa FOMEX, cuenta con distintos sitios de extensión variable entre 1-1.5 ha, para la selección del sitio se procuró que en la unidad de muestreo solo hubieran ejemplares con edad de 1.5 años, se realizó un muestreo en zigzag, a lo largo de una línea dentro de la unidad de muestreo de 1 ha, se seleccionaron 10 puntos de muestreo para obtener muestras compuestas preparadas con 10 submuestras, colectadas a una profundidad de 30 cm para el suelo a distancia, mientras que para el suelo rizosférico a una profundidad donde se alcanzó el sitio de máxima densidad de raíces procurando no cortar raíces vigorosas para evitar la muerte de la planta (Anexo A1) (SEMARNAT, 2002a).

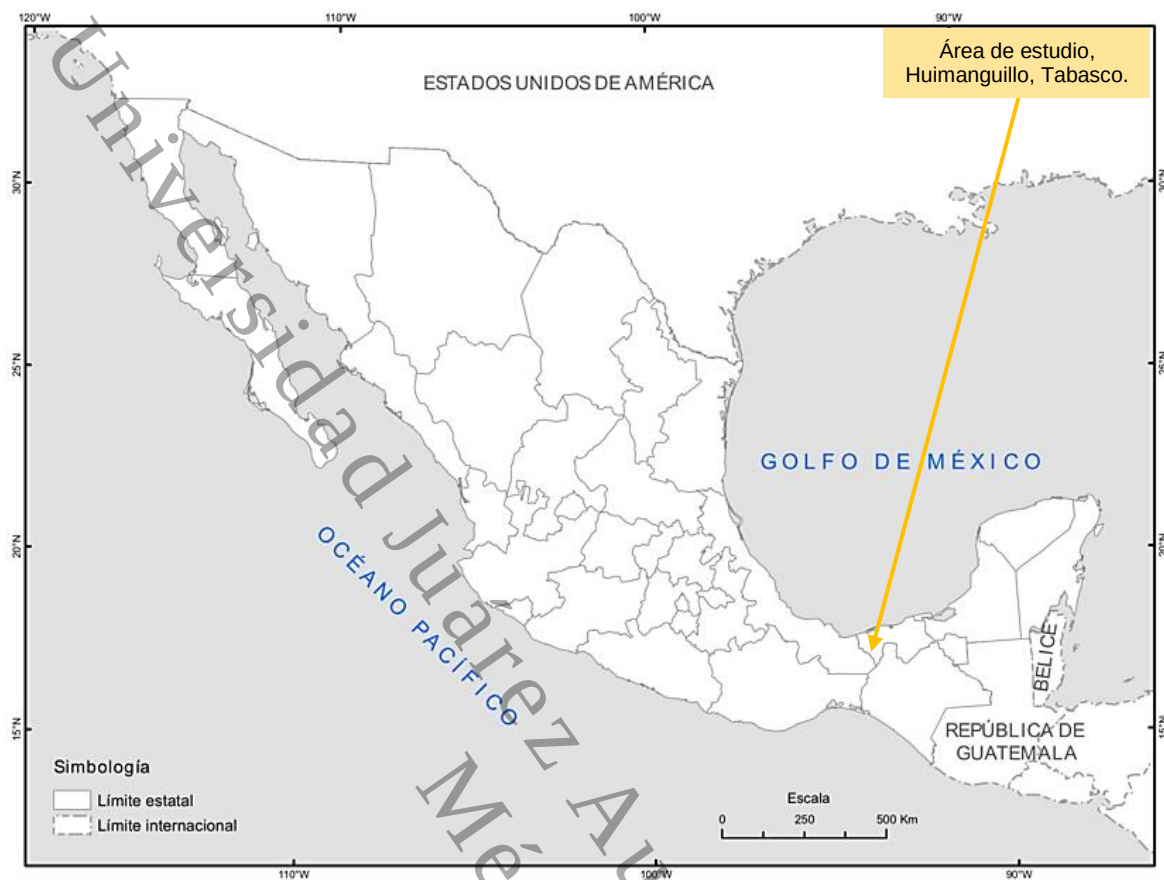


Figura 2.2. Localización Geográfica del área de estudio (CONABIO, 2012).

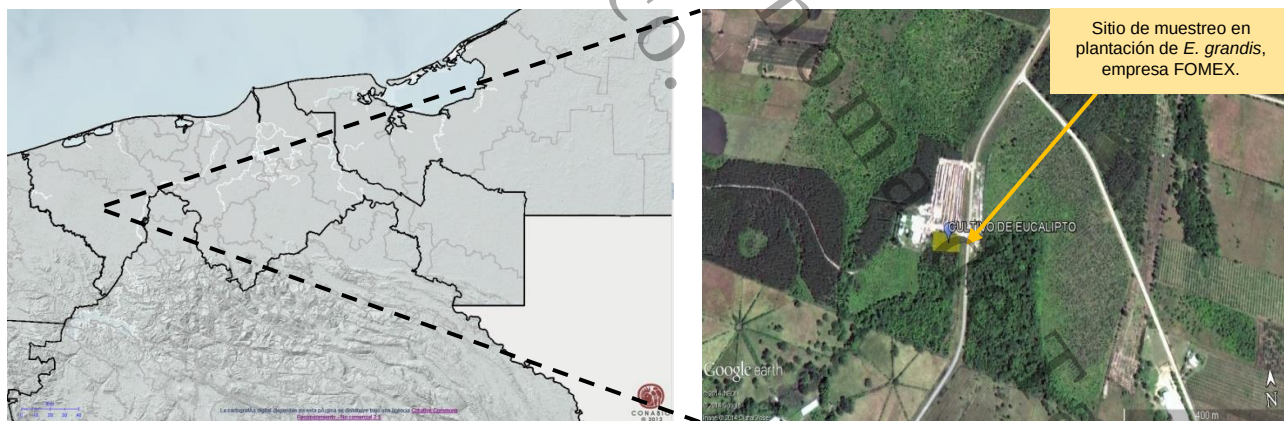


Figura 2.3. Imágenes satelitales del área de estudio (CONABIO, 2012; Google™ Earth)

2.1.3 Colecta y procesamiento de muestras de suelo

Las muestras de suelo rizosférico (para análisis microbiológico) y suelo a distancia (para análisis fisicoquímico) (Figura 2.4), fueron procesadas siguiendo las rutinas analíticas del método AS-01 de la NOM-021-SEMARNAT-2000 (Anexo A2), esta consistió en el traslado, recepción, registro, molienda, tamizado, homogenizado y almacenamiento (Figura 2.4), para esto las muestras de suelo fueron colocadas en frascos de vidrio esterilizados etiquetados y se conservaron en una hielera durante el trabajo de campo, después fueron transportadas al laboratorio y se refrigeraron a una temperatura de 4°C hasta su uso (SEMARNAT, 2002b).



Figura 2.4 Preparación de muestras de suelo.

2.1.4 Colecta de sustratos orgánicos

En el proceso de derribo de los árboles de eucalipto la parte que se aprovecha del árbol es únicamente la madera del tronco. Después del derribo de árboles, se realizan los procesos de desrame, tronzado y descortezado, estos procesos generan restos de corta que quedan en el suelo y suponen una gran cantidad de materia vegetal (ramas, hojas y corteza). El abandono de estos restos sobre las cepas impide el desarrollo de los brotes o una nueva plantación, por lo que generalmente se queman, se retiran de la plantación, se alinean en la plantación o se incorporan al terreno. Sin embargo, estos restos, tratados convenientemente pueden mejorar los rendimientos de la parcela mejorando la productividad. Más del 70% de los nutrientes del árbol están contenidos en las ramas, ramillas y

hojas, pudiendo dichos nutrientes retornar al cultivo en la siguiente rotación o plantación (González *et al.*, 1997). Por tal motivo se recolectó material orgánico del cultivo de eucalipto constituido principalmente por hojarasca, ramas y corteza de los árboles (Figura 2.5) que se utilizaron como soporte para inocular las BFN. También se utilizaron los desechos sólidos de la producción de pollos de engorde (pollinaza), compuestos de la base o cama de los galiones, la excreta y los residuos de alimentos y plumas que quedan en la cama, este residuo orgánico se obtuvo de una granja avícola del municipio de Cunduacán, Tabasco (Figura 2.5). La preparación de los sustratos hojarasca y pollinaza consistió en molerlos en un molino para obtener un tamaño milimétrico de partícula, mientras que la preparación del suelo consistió en molerlo con mazo hasta obtener un tamaño homogéneo.



Figura 2.5. Sustratos orgánicos a) Suelo, b) Pollinaza y c) Material orgánico del cultivo de eucalipto.

2.2 ETAPA II. Caracterización fisicoquímica y microbiológica del suelo del cultivo de eucalipto

2.2.1 Materiales y equipos

Los equipos, materiales y reactivos utilizados en las determinaciones físicas, químicas y microbiológicas de esta investigación se enlistan en la Tabla 2.1.

Tabla 2.1. Equipos, materiales y reactivos utilizados.

Reactivos y equipos	Marca
CaCO ₃ , Difenilamina, FeSO ₄ · 7H ₂ O, HCl, H ₃ PO ₄ , H ₂ SO ₄ al 98-99%, KCl, K ₂ Cr ₂ O ₇ , KH ₂ PO ₄ , KNO ₃ , KOH, K ₂ SO ₄ , Manitol, MgCl ₂ · 6H ₂ O, MgO, MgSO ₄ · 7H ₂ O, NaCl, NaOH, (NH ₄) ₂ SO ₄ , Rojo Congo, Rojo de metilo, Fe EDTA, Na ₂ MoO ₄ · 2H ₂ O, MnSO ₄	Fermont
CH ₃ CH ₂ OH al 99.9%, C ₆ H ₇ O ₅ OH, H ₃ BO ₃ puro, K(SbO) C ₄ H ₄ O ₆ · ½ H ₂ O, NH ₄ F, (NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ · 4H ₂ O, Soluciones reguladoras de pH 4, 7 y 10, Buffer fosfato estéril 0.06 M	J. T. Baker
Ácidoindolacético	Sigma-Aldrich
Ácido málico	REASOL
Peptona, triptófano, Alcohol etílico, FeCl ₃	CIVEQ
CaCl ₂ · 2H ₂ O, ácido glutámico	BAKER ANALYZED
Agar-Agar, Extracto de carne, Extracto de levadura	BD Bioxon
CuSO ₄ · 5H ₂ O,	REPROQUIFIN, S. A.
Dextrosa	BD DIFCO
FeCl ₃ · 6H ₂ O, NH ₄ Cl	GOLDEN BELL
H ₂ O destilada	HYCEL
Glutaraldehído	Sigma-Aldrich
Urea	FYPA
Verde de bromocresol, ZnSO ₄ · 7H ₂ O	Técnica Química, S.A.
Agitador magnético digital con calefacción, Mod. Cimarec	ThermoScientific
Autoclave acero inoxidable, Mod. 1925X	ALL AMERICAN
Balanza analítica, Mod. VE-204 capacidad 220 g	VELAB
Bomba de vacío	Novatech
Campana de flujo laminar horizontal, Mod. A75000	ScorpionScientific
Compresor de aire 1.5 W	ELITE 802
Espectrofotómetro UV-Vis, 325 a 1100 nm, Mod. GENESYS 20	ThermoSpectronic
Estufa 1600 W, Mod. 854 Schwabach	Memmert
Incubadora, Mod. IC403C	Yamato
Microscopio Electrónico de Barrido, Mod. JSM 6010-LA	JEOL
Microscopio óptico, Mod. VE-BC1	VELAB
Papel filtro número 42 de 5.5 cm	Whatman
Parrilla de agitación, Mod. 1002 Stirrer	JENWAY
Potenciómetro manual, Mod. HI 9813-6	HANNA instruments
Termómetro digital tipo pluma, Mod. 9847N	TAYLOR
Vernier digital, Mod. PA-158	Electronic LCD
Vortex, Mod. M16715	Barnstead International

2.2.2 Análisis de propiedades fisicoquímicas del suelo

Las muestras de suelo a distancia para la medición de las propiedades físicas y químicas se secaron a temperatura ambiente a la sombra a una temperatura no mayor a 35°C y una humedad relativa entre 60%, las muestras orgánicas se

fragmentaron con rodillos y se tamizaron en malla 10 (2 mm) (ANEXO A2). Se evaluó nitrógeno total (%) (Anexo A3), fósforo extraíble ($\text{mg}\cdot\text{Kg}^{-1}$ de suelo) (Anexo A4), materia orgánica (%) (Anexo A5), pH (Anexo A6) (Figura 2.6), contenido de humedad (Anexo A7), conductividad eléctrica (Anexo A8) y densidad aparente (Anexo A9), siguiendo las rutinas analíticas indicadas en la NOM-021-SEMARNAT-2000 (SEMARNAT, 2002b,c,d,e,f,g,h,i). Los resultados de la caracterización fisicoquímica del suelo permitieron proporcionarle los compuestos apropiados, en cantidad y balance adecuado para el crecimiento de plántulas de eucalipto al momento de establecerlas para su crecimiento en invernadero.



Figura 2.6. Determinación de pH en muestras de suelo.

2.2.3. Análisis microbiológico del suelo

2.2.3.1 Esterilización

El material e instrumental utilizado para los análisis microbiológicos se esterilizaron para eliminar todo tipo de microorganismos y para asegurar la ausencia absoluta de cualquier forma viviente en los mismos. Para trabajar en condiciones asépticas se utilizó una campana de flujo laminar horizontal y en ocasiones la proximidad de la llama de un mechero Bunsen. Se utilizaron distintas formas de esterilización para el material e instrumental (SSA, 1995; García & Vicente, 2003; Tortora *et al.*, 2007; Madigan *et al.*, 2012):

Esterilización con calor seco: El calor seco produce la destrucción de los microorganismos por oxidación de sus componentes celulares, es un sistema de esterilización apto para material termorresistente. Las asas de inoculación se esterilizaron a flama directa y todo el material de vidrio se esterilizó en una estufa a 170-175°C durante 2 horas.

Esterilización con calor húmedo: El calor húmedo destruye a los microorganismos sobre todo por la coagulación de las proteínas (desnaturalización), es efectivo para esterilizar material termorresistente. Para esterilizar los medios de cultivos y tubos de dilución se utilizó una autoclave con vapor de agua a presión para alcanzar una temperatura de 121°C±1.0°C durante 15 minutos como mínimo.

Esterilización con radiaciones UV: Se utilizaron radiaciones no ionizantes de luz ultravioleta (UV), esta luz lesiona el DNA de las células expuestas, se emitieron radiaciones UV a una longitud de onda de 260 nm durante 5 minutos para esterilizar superficies.

Esterilización por filtración: Se utilizaron filtros de membrana estériles con tamaños de poro de 0.2 micras de diámetro para retener células microbianas, a través este filtro se alimentó aire al biorreactor en los cuales se reprodujeron las BFN.

Desinfección con alcohol etílico concentrado: El alcohol tiene una actividad limitada contra esporas bacterianas y algunos virus por lo que solo se utilizó para desinfectar aparatos e instrumentos de plástico.

2.2.3.2 Evaluación la población de BFN en suelo rizosférico

La evaluación de la densidad de poblaciones de bacterias fijadoras de nitrógeno de los géneros *Azotobacter* sp y *Azospirillum* sp en suelo rizosférico se realizó con el método de conteo viable de células vivas por siembra en superficie (Madigan et

al., 2012). Para bacterias del género *Azospirillum* sp (AZP) se utilizó el medio de cultivo Rojo Congo (Anexo A10) (Döbereiner *et al.*, 1995; Holguín *et al.*, 1996) y para bacterias del género *Azotobacter* sp (AZT) se utilizó el medio de cultivo Ashby (Anexo A11) (Figura 2.7) (Subba, 1999).

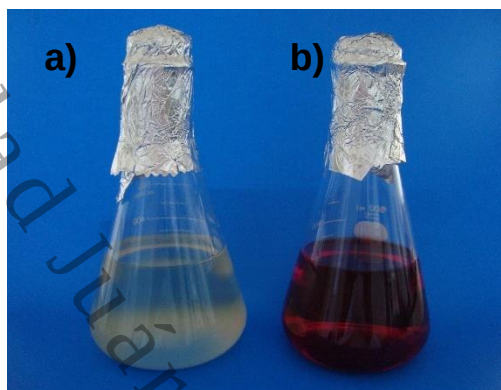


Figura 2.7. Medios de cultivo, a) Ashby y b) Rojo Congo.

Una célula viable es aquella que es capaz de dividirse y originar descendencia. Normalmente se determina el número de células de la muestra que es capaz de formar colonias sobre un medio sólido adecuado. En este procedimiento se supone que cada célula viable puede crecer y dividirse hasta formar una colonia. Así el número de colonias y el número de células son proporcionales (Madigan *et al.*, 2012).

Se utilizaron diluciones seriadas con base en 10, se diluyeron 10 g de suelo rizosférico fresco en 90 mL de agua estéril, la mezcla se agitó durante 15 minutos y se dejó reposar durante otros 15 minutos, de esta dilución se tomó 1 mL y se adicionó a un tubo de dilución que contenía 9 mL de agua destilada estéril, esta dilución se agitó por 1 minuto y se repitió el procedimiento para obtener diluciones sucesivas, hasta 10^{-4} . Posteriormente, de las diluciones 10^{-3} y 10^{-4} por triplicado se tomó 0.1 mL de cada dilución y se colocó en el centro de la caja de Petri con medios de cultivos sólidos específicos, distribuyéndose con una espátula de Drigalski (Figura 2.8) (Madigan *et al.*, 2012). Los cultivos permanecieron en una estufa de incubación a una temperatura de 32°C durante 5 días según Borda *et al.* (2009). Posteriormente se contaron las células viables, contando las unidades

formadoras de colonias (UFC) que crecieron en la superficie del medio de cultivo de la caja de Petri, luego se transformó a $\text{UFC} \cdot \text{g}^{-1}$ de suelo seco.

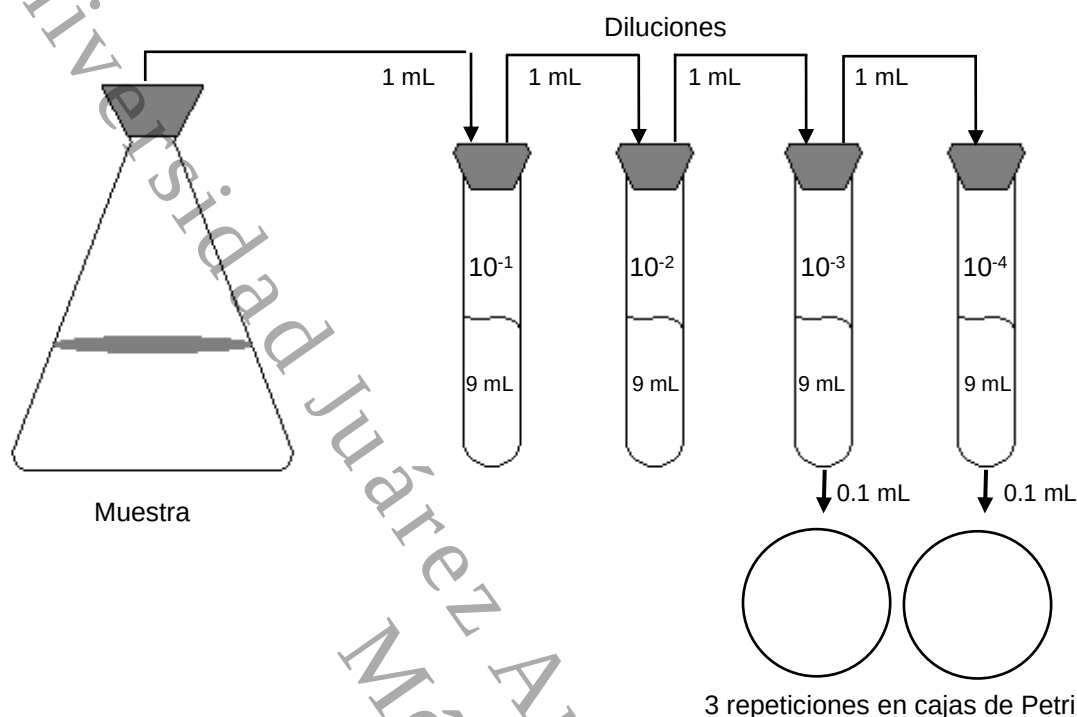


Figura 2.8. Procedimiento para la determinación de viables usando diluciones seriadas de la muestra y el método de siembra por extensión en placa (Madigan *et al.*, 2012).

Para el conteo se consideró que cada colonia puede proceder de una sola célula o de una agrupación (unidad viable), el conteo se realizó de manera manual y visual, para esto cada caja de Petri (con colonias desarrolladas en la superficie de medios de cultivos sólidos) se colocó a contra luz en una campana de flujo laminar horizontal, se consideraron las colonias apreciables a simple vista y se colocó una marca en el lugar de cada colonia. Los resultados fueron considerados positivos cuando se observó que las colonias de BFN del género *Azospirillum* sp absorbieron el rojo Congo (Holguín *et al.*, 1996) y las colonias de *Azotobacter* sp presentaron un aspecto traslúcido (Subba, 1999) (Figura 2.9).

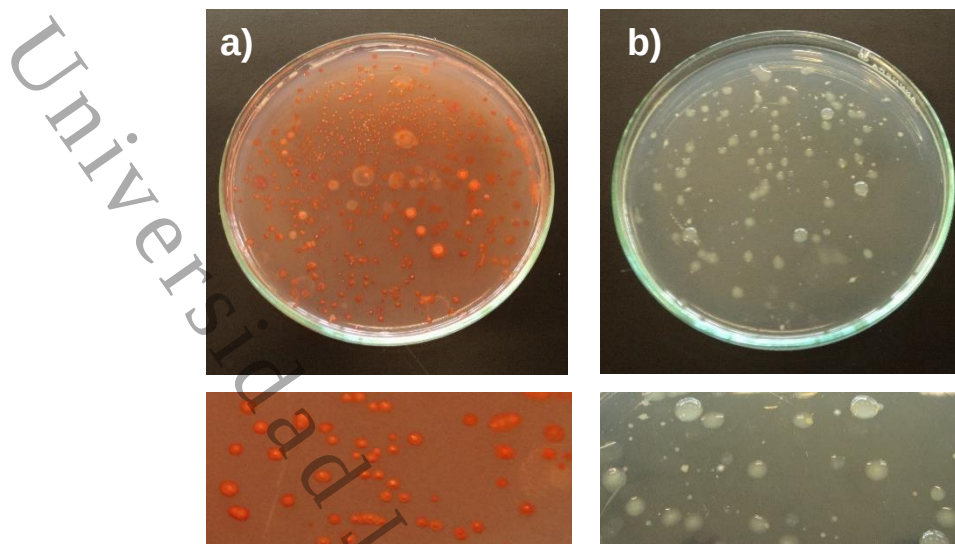


Figura 2.9. Células viables en unidades formadoras de colonias de a) *Azospirillum* sp, b) *Azotobacter* sp.

2.3 ETAPA III. Selección de bacterias fijadoras de nitrógeno

Las bacterias fijadoras de nitrógeno (BFN) fueron seleccionadas en seis fases:

- Fase 1. Caracterización de la morfología colonial de cultivos microbianos.
- Fase 2. Aislado de bacterias.
- Fase 3. Tinción de Gram de BFN.
- Fase 4. Caracterización externa de BFN.
- Fase 5. Selección de las BFN en función de la producción de ácido indolacético (AIA).
- Fase 6. Reproducción de BFN.

Fase 1. Caracterización de la morfología colonial de cultivos microbianos

Las colonias de bacterias se caracterizaron en su morfología externa a nivel colonia en placa, esta identificación se basó en la observación de las características de desarrollo en medio sólido donde la formación de colonias visibles con características particulares permitió diferenciar a los microorganismos, evaluando su forma, elevación, borde, consistencia y color (Anexo A12) (Aquiahuatl *et al.*, 2012; Madigan *et al.*, 2012).

Fase 2. Aislado de bacterias

En la fase anterior se obtuvieron poblaciones de BFN formadas por comunidades de gran complejidad, por lo que en esta fase se aislaron las bacterias de interés. El aislamiento se realizó mediante el método para obtener cultivos puros por siembra en estría en placa en cultivos sólidos Ashby para *Azotobacter* sp y Rojo Congo para *Azospirillum* sp (Anexo 10 y A11) y así, se obtuvieron cultivos puros identificados como cepas, que contenían un solo tipo de microorganismo con la misma composición genética (Aquiahuatl *et al.*, 2012; Madigan *et al.*, 2012). El procedimiento fue el siguiente:

1. Dividir cada una de las cajas de Petri por la parte de atrás en cuatro cuadrantes. Esterilizar el asa con calor en el mechero tipo Meker-Fisher.
2. Dejar enfriar el asa y tomar la muestra de una colonia (*Azotobacter* sp o *Azospirillum* sp identificadas en la fase anterior).
3. Inocular la muestra haciendo 4 o 5 estrías simples muy juntas de lado a lado sobre el primer cuadrante de la caja. Flamear el asa de inoculación y hacer girar la caja de Petri un cuarto de vuelta.
4. Abrir nuevamente la caja y con el asa de siembra esterilizada y fría, tocar la superficie de la caja con estrías recién hechas en un punto alejado del inicio. Hacer un segundo grupo de estrías como en el caso anterior. Realizar el mismo procedimiento en el tercer cuadrante y en el último cuadrante, sin flamear el asa de siembra hará una estría más abierta (simple).
5. Las cajas con la base hacia arriba se guardan en bolsas de plástico desinfectadas con alcohol y se incuban a 35°C durante 24-48 horas.

Fase 3. Tinción de Gram de BFN

Se realizó la Tinción de Gram a las cepas de BFN aisladas en la fase 2, esta caracterización es una tinción diferencial y la reacción diferente a esta tinción se basa en las diferencias que existen en la estructura de las paredes celulares. El procedimiento utilizado fue el de Madigan *et al.* (2012):

Paso 1. Tinción del frotis, fijado a la llama, con cristal violeta durante 1 minuto. (Resultado: todas las células se tiñen de color violeta).

Paso 2. Adición de la solución yodo-yodurada de lugol durante 1 minuto. (Resultado: todas las células permanecen de color violeta).

Paso 3. Decoloración breve con alcohol durante 20 segundos. (Resultado: las células Gram positivas permanecen de color violeta y las Gram negativas se decoloran)

Paso 4. Tinción de contraste con safranina durante 1-2 minutos. (Resultado: las células Gram positivas se ven de color violeta y las Gram negativas de color rosa).

Paso 5. Colocar una gota de aceite de inmersión en el portaobjetos y examinar con objetivo de 10X en el microscopio óptico (Figura 2.10).

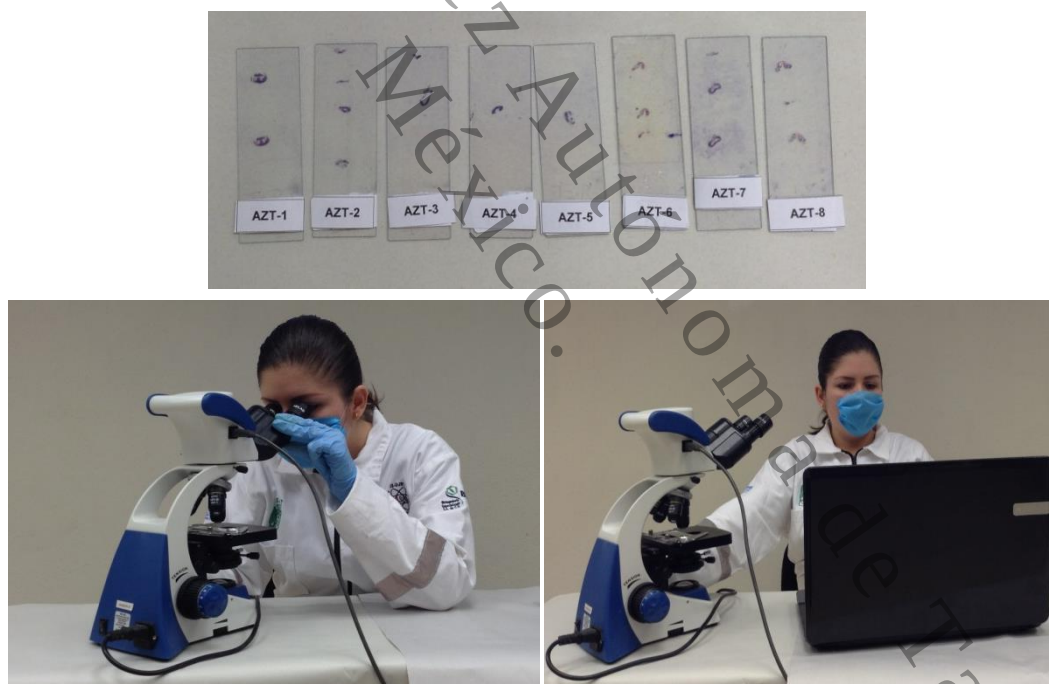


Figura 2.10. Análisis de la tinción de bacterias del género *Azotobacter* sp y *Azospirillum* sp en un microscopio binocular biológico con cámara digital.

Fase 4. Caracterización externa de BFN

La morfología celular de las cepas aisladas se analizó por microscopía electrónica de barrido, la preparación de las muestras consistió en suspender cada cepa en

agua destilada estéril y centrifugar a 3500 rpm durante 10 min, posteriormente se eliminó el sobrenadante y se centrifugó nuevamente, repitiendo este procedimiento cinco veces para lograr una limpieza adecuada de las bacterias, consecutivamente el contenido de cada tubo se filtró en papel filtro de 0.2 μm , el filtrado se fijó con $\text{OHC}(\text{CH}_2)_3\text{CHO}$ (glutaraldehído) y se deshidrató con diluciones progresivas de etanol al 30%, 50%, 70%, 90% y 100%, se colocaron sobre cinta de carbono de doble cara en un portamuestra, se metalizaron con una capa ultradelgada de oro y se observaron en condiciones de alto vacío en un microscopio electrónico de barrido JEOL Modelo 6010-LA (Figura 2.11) (Dykstra, 1993; Bozzola & Russell, 1999; Vázquez & Echeverría 2000). Para el procesamiento de imágenes se utilizó el Software InTouchScope™.



Figura 2.11. Análisis morfológico de BFN en un microscopio electrónico de barrido.

Fase 5. Selección de las BFN en función de la producción de ácido indolacético (AIA)

Se tomaron los cultivos bacterianos aislados, se cuantificó su concentración por recuento de unidades formadoras de colonias ($\text{UFC} \cdot \text{mL}^{-1}$) sobre agar. El recuento se realizó a las 72 h y se ajustó la concentración celular con solución salina (0.85 % NaCl) hasta obtener $1 \times 10^7 \text{ UFC} \cdot \text{mL}^{-1}$. Se inoculó 30 mL de caldo Dygs al 2 % y se incubó durante 48 h a 32 °C y 120 rpm. La biomasa obtenida se centrifugó a 8,000 rpm durante 10 min. Se descartó el sobrenadante y las células se suspendieron en 30 mL de buffer fosfato estéril 0.06 M. De esta suspensión celular se tomaron 100 mL y se inocularon 50 mL de caldo BT modificado, sin solución de vitaminas y con una concentración de 20 $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ de triptona como precursor del ácido indolacético y 0.2 $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ de NH_4Cl como fuente de nitrógeno. Se incubaron en

oscuridad y se agitó a 120 rpm y 32 °C durante 48 h (Celis & Gallardo, 2008; Obando *et al.*, 2010). Posteriormente, se centrifugaron 10 mL del caldo microbiano a 8,000 rpm durante 10 min, se tomaron 2 mL del sobrenadante y se adicionaron 8 mL de reactivo de Salkowsky hasta obtener la coloración rosada (Confirmación de presencia de compuestos indólicos). Se realizó la lectura de la absorbancia de las muestras a 535 nm de longitud de onda en un espectrofotómetro de UV-Vis. La concentración AIA se calculó mediante la concentración de compuestos indólicos, utilizando una ecuación ajustada por el método de mínimos cuadrados. Esta ecuación se obtuvo realizando regresión lineal a una curva de calibración que se construyó a partir de diferentes concentraciones de AIA (25, 50, 100, 150, 200, 250 y 300 μ M) con la adición del reactivo de Salkowsky y leídas a 535 nm de longitud de onda en el mismo espectrofotómetro (Kuss, 2006; Obando *et al.*, 2010).

Fase 6. Preparación del Inóculo de BFN

Los cultivos de enriquecimiento exitosos requieren un inóculo adecuado que contenga el organismo de interés (Madigan *et al.*, 2012). En este sentido, la elaboración del inóculo consistió en hacer crecer a las bacterias que produjeron más ácido indolacético (AIA); de manera individual cada aislado de bacteria se hizo crecer en medio de cultivo sólido, posteriormente se realizó un lavado de placa, para esto se prepararon 100 mL de una solución salina de NaCl al 0.85% estéril y posteriormente se añadió a la placa de Petri que contenía la bacteria aislada, cubriéndola totalmente para luego retirar suavemente la bacteria con el asa de siembra (Figura 2.12) y resuspender las bacterias en esta solución mediante agitación (Madigan *et al.*, 2012).

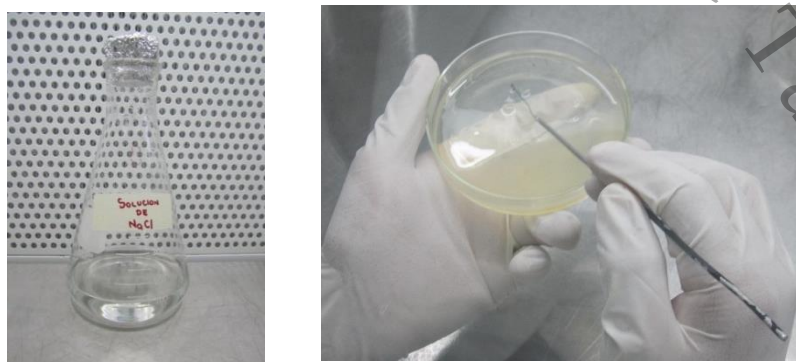


Figura 2.12. Lavado de bacterias en caja de Petri, utilizando solución salina y asa bacteriológica.

Con ayuda de una jeringa estéril se tomó 1 mL de la solución salina que contenía la cepa de interés y se colocó en un biorreactor con medio de cultivo líquido estéril compuesto de 0.6 g de levadura, 1.5 mL de melaza y 0.3 L de agua destilada, (Hernández & Martínez, 2011) que es un medio alternativo de bajo costo, para formar una suspensión de células libres de mayor tamaño de población bacteriana. Los biorreactores con capacidad nominal de 0.5 L, contaban con accesos para la entrada de aire estéril (producidos por bomba para pecera, pasado por un filtro de membrana y controlado por válvulas), toma de muestra y una salida para liberar la presión del sistema (Figura 2.13) (Ojeda, 2009). Los biorreactores se mantuvieron a una temperatura de 29°C durante 15 días (Figura 2.14). El número de biorreactores establecidos correspondió al número de cepas seleccionadas por la mayor producción de AIA, con cuatro repeticiones. Para desinfectar el material utilizado en el montaje de los biorreactores se utilizó un recipiente con capacidad nominal de 10 L, se agregaron cinco litros de alcohol etílico concentrado. Posteriormente se sumergieron las mangueras de plástico, tomas de muestra y tubos de vidrio, dejándolos reposar por 24 h para su completa desinfección. Posteriormente se prepararon los consorcios de bacterias *Azospirillum* sp y *Azotobacter* sp, mezclando los inóculos de cada género en recipientes de vidrio previamente esterilizados.

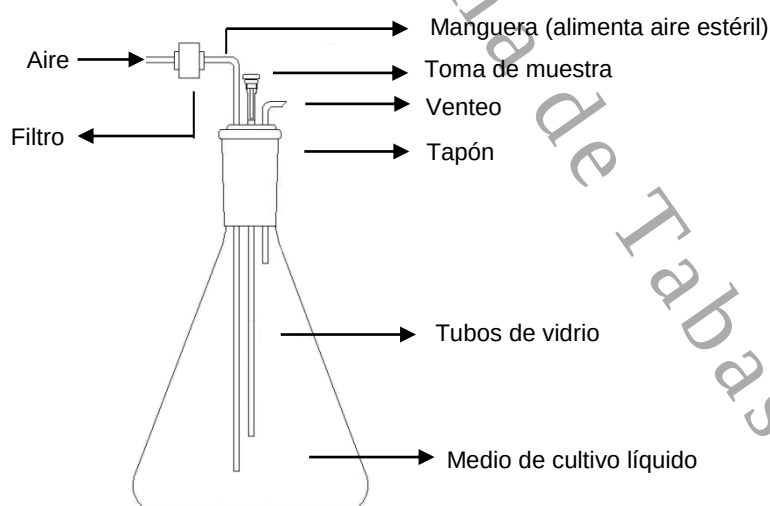


Figura 2.13. Esquema del biorreactor utilizado para la reproducción de bacterias.

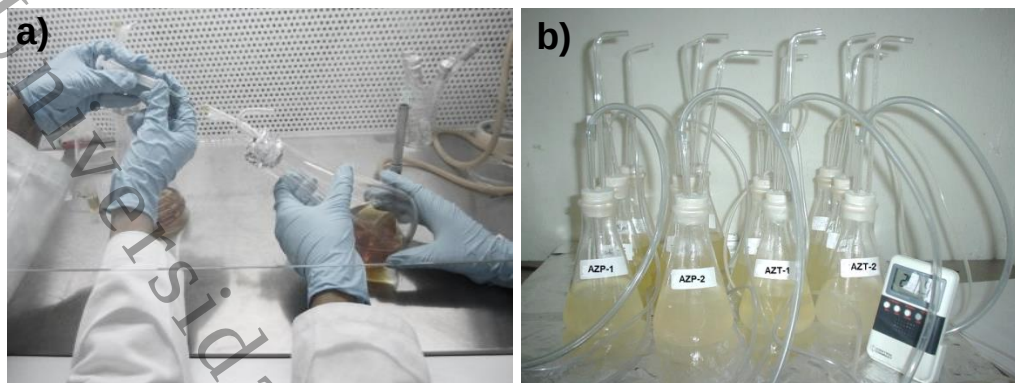


Figura 2.14. a) Inoculación de bacterias al biorreactor con ayuda de una jeringa estéril. b) Establecimiento de biorreactores para la reproducción de BFN.

2.4 ETAPA IV. Establecimiento del diseño experimental para la producción de biofertilizantes

2.4.1. Descripción de factores y niveles

El diseño experimental fue evaluado en el software estadístico SAS versión 9.1.3, como diseño experimental con dos niveles, completamente al azar con un arreglo factorial de $2 \times 2 \times 2$, para un total de 8 tratamientos con 4 repeticiones, resultando así 32 unidades experimentales (Figura 2.15) (SAS, 2004). Los factores fueron los siguientes sustratos:

- Factor FN. Fuente de nitrógeno (pollinaza), con los niveles de dosis: nivel bajo (-1) de 100 g y nivel alto (1) de 200 g.
- Factor FC. Fuente de carbono (hojas de eucalipto), con los niveles de dosis: nivel bajo (-1) de 300 g y nivel alto (1) de 500 g.
- Factor FS. Fuente de micronutrientes (suelo), con los niveles de dosis: nivel bajo (-1) de 50 g y nivel alto (1) de 100 g (Tabla 2.2).

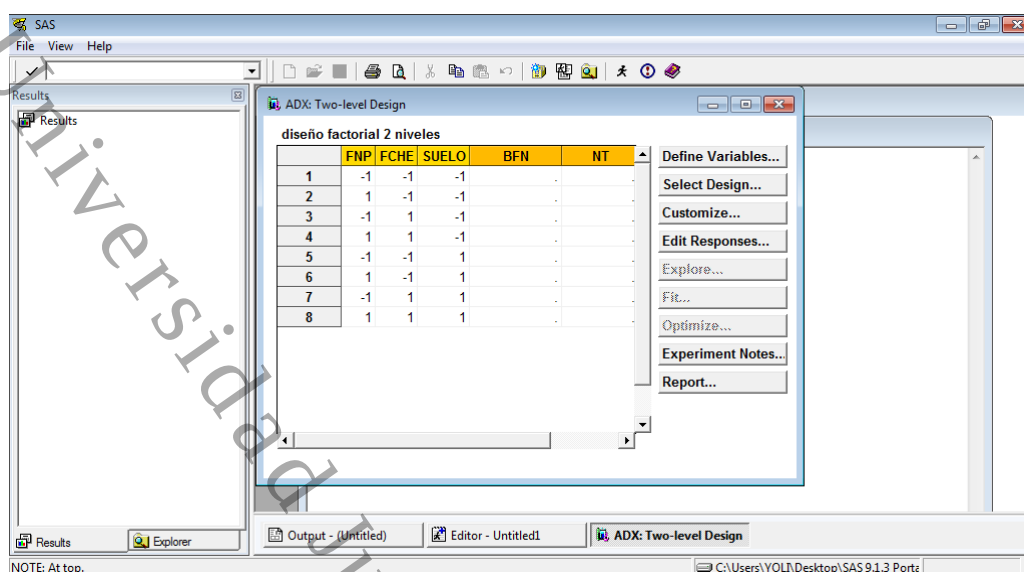


Figura 2.15. Generación del diseño experimental factorial en software estadístico SAS Versión 9.1.3.

Tabla 2.2. Descripción de tratamientos del bioensayo para la formulación de biofertilizantes nitrogenados.

Factores		
FN	FC	FS
-1*	-1	-1
1**	-1	-1
-1	1	-1
1	1	-1
-1	-1	1
1	-1	1
-1	1	1
1	1	1

* Nivel bajo, ** Nivel alto

2.4.2 Establecimiento de las unidades experimentales

Los sustratos orgánicos una vez secos, molidos y tamizados se pesaron de acuerdo a los tratamientos resultantes (Tabla 2.2), se colocaron en bolsas de papel estraza y se cubrieron con papel aluminio para esterilizarse en autoclave. Posteriormente se determinó la humedad y se establecieron como unidades experimentales en bolsas de polietileno desinfectadas de 27x28 cm, agregando un volumen del consorcio de *Azospirillum* sp para la producción de los biofertilizantes BIO-AZP (Tabla 2.3) y consorcio de *Azotobacter* sp para la producción de los biofertilizantes BIO-AZT (Tabla 2.4) y homogeneizando hasta 32% de humedad.

Tabla 2.3. Descripción de tratamientos y unidades experimentales del bioensayo para la formulación de biofertilizante nitrogenado inoculado con bacterias del género *Azospirillum* sp (BIO-AZP).

Tratamientos	Descripción	Distribución de unidades experimentales
BIO-AZP1	NB [†] FN [♀] + NB FC [♂] + NB FS [¥] + CAZP [£]	1 2 3 4
BIO-AZP2	NA [♂] FN + NB FC + NB FS + CAZP	5 6 7 8
BIO-AZP3	NB FN + NA FC + NB FS + CAZP	9 10 11 12
BIO-AZP4	NA FN + NA FC + NB FS + CAZP	13 14 15 16
BIO-AZP5	NB FN + NB FC + NA FS + CAZP	17 18 19 20
BIO-AZP6	NA [♂] FN + NB FC + NA FS + CAZP	21 22 23 24
BIO-AZP7	NB FN + NA FC + NA FS + CAZP	25 26 27 28
BIO-AZP8	NA FN + NA FC + NA FS + CAZP	29 30 31 32

[†]Nivel bajo, [♂]Nivel Alto, [♀]Fuente de nitrógeno pollinaza, [♂]Fuente de Carbono hojas de Eucalipto, [¥]Suelo, [£]Consortio de bacterias del género *Azospirillum* sp.

Tabla 2.4. Descripción de tratamientos y unidades experimentales del bioensayo para la formulación de biofertilizante nitrogenado inoculado con bacterias del género *Azotobacter* sp (BIO-AZT).

Tratamientos	Descripción	Distribución de unidades experimentales
BIO-AZT1	NB [†] FN [♀] + NB FC [♂] + NB FS [¥] + CAZT [£]	1 2 3 4
BIO-AZT2	NA [♂] FN + NB FC + NB FS + CAZT	5 6 7 8
BIO-AZT3	NB FN + NA FC + NB FS + CAZT	9 10 11 12
BIO-AZT4	NA FN + NA FC + NB FS + CAZT	13 14 15 16
BIO-AZT5	NB FN + NB FC + NA FS + CAZT	17 18 19 20
BIO-AZT6	NA FN + NB FC + NA FS + CAZT	21 22 23 24
BIO-AZT7	NB FN + NA FC + NA FS + CAZT	25 26 27 28
BIO-AZT8	NA FN + NA FC + NA FS + CAZT	29 30 31 32

[†]Nivel bajo, [♂]Nivel Alto, [♀]Fuente de nitrógeno pollinaza, [♂]Fuente de Carbono hojas de Eucalipto, [¥]Suelo, [£]Consortio de bacterias del género *Azotobacter* sp.

Para estudiar el efecto de los niveles y factores del diseño experimental sobre las variables respuesta se utilizó el modelo estadístico de la Ecuación 2.1 (Montgomery, 2002):

$$Y_{ijl} = \mu + FN_i + FC_j + FS_l + (FNFC)_{ij} + (FNFS)_{il} + (FCFS)_{jl} + (FNFCFS)_{ijl} + \epsilon_{ijl} \dots \dots (Ec. 2.1)$$

Donde:

- Y_{ijk} = Representa el efecto de los factores en las variables a medir.
- μ = Media General.
- FN_i = Efecto que produce el i-ésimo nivel del factor FN.
- FC_j = Efecto que produce el j-ésimo nivel del factor FC.
- FS_l = Efecto que produce el l-ésimo nivel del factor FS.
- $(FNFC)_{ij}$ = Representa el efecto de la Interacción del i-ésimo nivel del factor FN y del j-ésimo nivel del factor FC.

- (FNFS)_{il} = Representa el efecto de la Interacción del i-ésimo nivel del factor FN y del l-ésimo nivel del factor FS.
- (FCFS)_{jl} = Representa el efecto de la Interacción del j-ésimo nivel del factor FC y del l-ésimo nivel del factor FS.
- (FNFCS)_{ijl} = Representa el efecto de la Interacción de i-ésimo nivel del factor FN, j-ésimo nivel del factor FC y del l-ésimo nivel del factor FS.
- ε_{ijl} = Error aleatorio.

2.4.3. Análisis de las características químicas de los biofertilizantes

La toma de muestra consistió en homogeneizar los biofertilizantes contenidos en las bolsas plásticas previamente identificadas, obtener la muestra en condiciones asépticas y posteriormente cerrar la bolsa plástica para evitar posible contaminación de las unidades experimentales. Se determinaron pH, Materia orgánica, Carbono orgánico, Nitrógeno total.

- pH. Se preparó una mezcla de 1:5 (peso-volumen⁻¹) de la muestra en agua, se agitó y se dejó reposar (Isaza et al., 2009). Para la determinación del pH se utilizó un potenciómetro Hanna Instruments HI 9813-6.
- Materia orgánica. La Materia orgánica se determinó por el método de combustión a 550 °C durante 2.5 h en una mufla (Brewer & Sullivan, 2003).
- Carbono orgánico. La determinación del carbono orgánico se obtuvo por medio de una relación entre la materia orgánica y un factor indicativo de la cantidad de carbono orgánico presente en dicha materia, indicada en la Ecuación 2.2 (SEMARNAT, 2002e).

$$CO = \frac{\% \text{ Materia Orgánica}}{1.724} \dots\dots\dots (\text{Ec. 2.2})$$

- Nitrógeno total. El nitrógeno total se determinó mediante la técnica Microkjeldhal, que involucra dos pasos, la digestión de la muestra para convertir el nitrógeno a NH₄⁺ y la determinación de NH₄⁺ en el digestado.

Los muestreos y análisis se realizaron al inicio del proceso (día 1), durante el proceso (día 30) y al final del proceso (día 60), esto se debe a que sólo se buscaba

obtener un comportamiento de la dinámica de las variables fisicoquímicas durante el proceso y seleccionar el tiempo óptimo para la producción de los biofertilizantes. También se midió el tamaño de población de bacterias utilizando el método descrito en el apartado 2.2.3.2. Todos los parámetros se determinaron en el Laboratorio de Biotecnología de la División Académica de Ingeniería y Arquitectura de la Universidad Juárez Autónoma de Tabasco.

2.5 ETAPA V. Evaluación de los biofertilizantes en condiciones de invernadero

Para estudiar el efecto de los biofertilizantes sobre las plántulas, se estableció un diseño experimental unifactorial completamente al azar (relación 1:1 del mejor tratamiento inoculado con *Azospirillum* sp “BIO-AZP” y del mejor tratamiento inoculado con *Azotobacter* sp “BIO-AZT”). Se aplicaron 4 dosis de biofertilizantes: 200 g, 300 g, 400 g y 500 g, comparado con el fertilizante químico urea (46% N) que convencionalmente se utiliza en los cultivos de eucalipto, con dosificación de 18 g por plántula (Smethurst *et al.*, 2003) y un testigo (sin fertilización) con 4 réplicas para cada caso, resultando 24 unidades experimentales (Tabla 2.5).

Tabla 2.5. Descripción de tratamientos y unidades experimentales en condiciones de invernadero.

Tratamientos	Descripción	Distribución de unidades experimentales
T1-BIO1	Biofertilizante Dosis 1: 200 g	1 2 3 4
T2-BIO2	Biofertilizante Dosis 2: 300 g	5 6 7 8
T3-BIO3	Biofertilizante Dosis 3: 400 g	9 10 11 12
T4-BIO4	Biofertilizante Dosis 4: 500 g	13 14 15 16
T5-FQ	Fertilizante químico urea	17 18 19 20
T6-T	Testigo	21 22 23 24

Cada unidad experimental consistió en un contenedor de polietileno (40 cm de diámetro y 45 cm de altura) con suelo no rizosférico. En los contenedores se aplicaron los tratamientos correspondientes y se sembraron las plántulas de *Eucalyptus grandis* con edad de 40 días, desarrolladas en sistema de siembra suelo en vivero con características morfológicas similares.

La investigación se realizó bajo condiciones de invernadero con cubierta transparente de policarbonato de perfil tubular localizado a 18°4' latitud norte, 93°10' longitud oeste y altitud de 10 msnm, en el municipio de Cunduacán, Tabasco (INEGI, 2015b). Para el establecimiento de las plántulas se consideraron los requerimientos ambientales de la especie para estación seca y se aplicó riego dos veces al día (FAO, 1981). Para el control de plagas se aplicó un biocida natural (que ofrece una solución más sostenible para el control de plagas), elaborado a partir de aceites esenciales de eucalipto, su preparación consistió en secar hojas de eucalipto a la sombra a 25 ± 5 °C por dos semanas acorde con lo recomendado por Moreno *et al.* (2010), posteriormente se hizo la extracción del aceite esencial con la técnica de arrastre de vapor (Batish *et al.*, 2008; González *et al.*, 2010; Reyes *et al.*, 2012). Las plántulas fueron monitoreadas por 3.5 meses, debido a que en la mayor parte de las regiones tropicales y subtropicales, la altura media de la plántula para la plantación puede obtenerse en 4-5 meses (FAO, 1981; Martínez *et al.*, 2006). Para estudiar la tasa de crecimiento de las variables dasométricas de plántulas de *E. grandis* se realizó un análisis de regresión lineal por el método de mínimos cuadrados, utilizando el modelo de la Ecuación 2.3 (Montgomery, 2002):

$$y = mx + b \dots\dots\dots (\text{Ec. 2.3})$$

Donde:

- y = Variable respuesta (variable dependiente).
- m = Tasa de crecimiento (Pendiente).
- x = Tiempo (variable independiente).
- b = Ordenada al origen.

2.5.1. Efecto de la aplicación de BFN sobre las características dasométricas de plántulas de eucalipto

Las plántulas de eucalipto sembradas en macetas fueron monitoreadas durante 3.5 meses, cada 15 días se registró la altura de la planta desde la base del tallo hasta el primordio foliar (medida con una regla graduada en cm), diámetro de tallo (medido con un vernier digital Electronic LCD modelo PA-158) y número de hojas

de cada unidad experimental (maduras y secas sujetas a la plántula). Al término del experimento las plántulas se retiraron de la maceta para determinar el peso fresco y el peso seco, para esta última evaluación, tanto la parte aérea (dividida en hojas y tallos) como la raíz fueron colocadas en bolsas de papel y puestos a secar por 48 h a una temperatura de 70°C en una estufa con circulación forzada de aire caliente (Figura 2.16), hasta peso constante, y posteriormente se pesaron en una balanza electrónica VELAB modelo VE-204 (Chen *et al.*, 2006; Espinoza & Almaguer, 2007; Monsalve *et al.*, 2009).



Figura 2.16. Procedimiento de secado de plántulas de eucalipto para la determinación de peso seco de biomasa aérea y radical.

2.5.2. Estudio de las propiedades químicas del suelo de macetas cultivado con eucalipto

En el suelo de macetas se evaluaron las propiedades químicas indicadas en la Tabla 2.6, al inicio (día 1), tiempo medio (día 60) y al final (día 105) del experimento (SEMARNAT, 2002).

Tabla 2.6. Propiedades químicas medidas en suelo de macetas.

Propiedad	Procedimiento*	Método
pH (u. pH)	AS-02	Medido en agua, relación 1:2
Nitrógeno total (%)	AS-25	Kjeldahl
Fósforo disponible (mg·Kg ⁻¹)	AS-11	Bray y Kurtz 1
Materia orgánica (%)	AS-07	Walkley y Black

*NOM 021-SEMARNAT-2000. Anexos A3, A4, A5 y A6.

2.6 ETAPA VI. Análisis estadístico de las variables respuesta

Los resultados obtenidos de ambos experimentos se analizaron en el paquete estadístico Minitab ® Release 14.12.0., de este se obtuvo el análisis de varianza (ANOVA) con el fin de determinar el efecto de tratamientos sobre la variable respuesta, posteriormente la prueba de medias Tukey ($p \leq 0.05$) se realizó para el caso en que se rechace la igualdad de medias entre tratamientos. Los resultados analizados estadísticamente fueron, en biofertilizantes: población de bacterias fijadoras de nitrógeno, nitrógeno total, carbono orgánico y pH; en plántulas de Eucalipto: altura de la planta, diámetro del tallo, número de hojas y peso seco; en suelo de macetas: nitrógeno total, fósforo extraíble, pH y materia orgánica.

El análisis de los datos permitió encontrar la combinación significativa sobre las variables respuesta y optimizar la formulación y dosificación del biofertilizante, que produjeron un efecto benéfico significativo sobre las plántulas de eucalipto.

CAPÍTULO III. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1. Características del suelo cultivado con eucalipto

3.1.1 Propiedades fisicoquímicas de suelo cultivado con eucalipto

Los valores promedios de las variables edafológicas del suelo se muestran en la Tabla 3.1. El pH del suelo es moderadamente ácido, de acuerdo a la clasificación de suelos que hace la NOM-021-SEMARNAT-2000, resultados similares reportan Sicardi *et al.* (2004), con valores de pH de 4.2, Pérez (2010) con un valor mínimo de 3.7, máximo de 5.6 y medio de 4.8 y Uribe *et al.* (2012) con 3.9, en suelos con plantaciones de *E. grandis*. Estas características son muy particulares del suelo acrisol muestreado, que se caracteriza por ser ácido con bajos niveles de fertilidad y presenta una coloración superficial oscura sobre un basamento de color amarillo o rojo, material geológico del Pleistoceno y Terciario, característico en la zona de planicie y algunos lomeríos del municipio de Huimanguillo, Tabasco (Palma *et al.*, 2006).

Tabla 3.1. Características fisicoquímicas del suelo cultivado con *E. grandis*.

Parámetro	Min.	Max.	Media
pH	4.80	5.60	5.17
CE (dS·m ⁻¹)	0.30	0.36	0.33
MO (%)	4.50	5.80	5.50
CO (%)	2.61	3.36	3.19
D _{AP} (g·cm ⁻³)	0.84	0.94	0.90
N _T (%)	0.19	0.31	0.26
P (mg·Kg ⁻¹)	8.50	15.3	11.07
H (%)	30.0	36.0	32.0

CE=Conductividad eléctrica; MO= Materia Orgánica; CO: Carbono orgánico; D_{AP}= Densidad aparente; N_T= Nitrógeno Total; P= Fósforo extraíble; H=Humedad.

El contenido de materia orgánica (MO) fue de 5.50 % y la densidad aparente (D_{AP}) de 0.90 g·cm⁻³, de acuerdo a estos resultados, el suelo es considerado orgánico con altos contenidos de materia orgánica de acuerdo a la clasificación de la NOM-021-SEMARNAT-2000. Al respecto Prause y Gallardo (2000) mencionan que la relación MO - D_{AP} = Estructura, se ve favorecida en la medida que los sistemas agroforestales tienen aportes anuales de hojarasca suficiente como para modificar algunas propiedades físicas, químicas y biológicas del suelo. Céspedes (2007), menciona que los compuestos orgánicos solubles que genera la hojarasca de eucaliptos, son rápidamente descompuestos en el propio horizonte A₀ o en el A₁,

no alcanzando los horizontes profundos, y Murray *et al.*, (2011) afirman que los valores de MO del suelo y de la D_{AP} presentes en el sistema agroforestal, mejoran la estructura del suelo en los primeros 20 cm.

La conductividad eléctrica (CE) del suelo fue de $0.33 \text{ dS} \cdot \text{m}^{-1}$, que se considera con efectos despreciables de la salinidad, de acuerdo a la interpretación de la NOM-021-SEMARNAT-2000. El contenido de nitrógeno total (N_T) fue de 0.26 %, que se considera alto de acuerdo a la clasificación de la NOM-021-SEMARNAT-2000, resultados similares obtuvieron Uribe *et al.* (2012), al reportar valores de 0.21 y 0.27 %, y Pérez (2010) con valores de 0.20 %. El contenido de fósforo fue de $11.07 \text{ mg} \cdot \text{Kg}^{-1}$, que se considera como bajo de acuerdo a la clasificación de la NOM-021-SEMARNAT-2000.

Estos resultados pueden deberse a la presencia de residuos orgánicos (hojarasca, ramas y corteza), generados por la cobertura vegetativa de la plantación de *E. grandis*, que aporta materia orgánica, que después de incorporarse al suelo produce nutrimentos que son aprovechados cuando las condiciones son favorables (Betancourt *et al.*, 1999; Gliessman, 2002). En este sentido, la materia orgánica interviene significativamente en las propiedades físicas, químicas y biológicas del suelo, ya que influye en la estructura del suelo, en el suministro de elementos nutritivos, en la relación carbono/nitrógeno y en el aporte de alimento para los microorganismos (Ortiz & Ortiz, 1990; Prause & Gallardo, 2000). También es conocido que hay una estrecha relación entre las cantidades de materia orgánica en el suelo y los contenidos de carbono y nitrógeno, una estimación muy aproximada de los contenidos de MO puede obtenerse multiplicando los contenidos de carbono total por 2, o los contenidos de nitrógeno total por 20 (Gliessman, 2002).

3.1.2. Tamaño de población de BFN en suelo rizosférico cultivado con eucalipto

Diversas investigaciones (Manoharachary & Mukerji 2006; Reyes *et al.*, 2008; Córdova *et al.*, 2009; Rivera *et al.*, 2010) han reportado que existe mayor densidad

de microorganismos alrededor de la raíz respecto al suelo a distancia, debido a que se depositan compuestos como aminoácidos, vitaminas, azúcares, ácidos orgánicos, nucleótidos, flavonoides, enzimas, glucósidos, giberelinas, auxinas, saponícos y taninos, los cuales tienen un efecto selectivo sobre los microorganismos. Al respecto, en este trabajo el género *Azospirillum* sp se comportó como predominante con respecto al género *Azotobacter* sp (Tabla 3.2), según Alfonso *et al.* (2005) y Collados (2006) este resultado puede deberse a la amplia gama de hormonas vegetales que las bacterias *Azospirillum* sp exudan al medio, al metabolismo carbonado y nitrogenado muy versátil que poseen, lo que les permite adaptarse, establecerse y colonizar el ambiente rizosférico con mayor facilidad. Otras investigaciones (Croes *et al.*, 1993; Pereg *et al.*, 1998) han reportado que las bacterias del género *Azospirillum* sp, en un primer contacto con la planta, se unen a la superficie de la raíz en una rápida e irreversible adsorción debido a su flagelo polar glucosilado que es considerado una adhesina, seguido de un anclaje de agregados de células bacterianas, formados por la producción de material fibrilar.

Tabla 3.2. Número de bacterias diazotróficas del género *Azospirillum* sp y *Azotobacter* sp asociadas a *E. grandis*.

Perfil	UFC·g ⁻¹ suelo seco	
	<i>Azospirillum</i>	<i>Azotobacter</i>
Suelo rizosférico	101x10 ³	75x10 ³

3.2. Características macroscópicas y microscópicas de BFN del cultivo de Eucalipto

Los aislamientos de bacterias a partir de suelo rizosférico de *E. grandis*, dieron como resultado ocho cepas de *Azotobacter* sp y ocho cepas de *Azospirillum* sp, con características fenotípicas macro y microscópicas diferentes. En la Tabla 3.3, se observan las características morfológicas a nivel colonia de las bacterias en placa y las características microscópicas de ocho cepas de bacterias del género *Azotobacter* sp aisladas en medio de cultivo Ashby identificadas como AZT, los aislados predominantes se caracterizaron por ser colonias acuosas y viscosas, con elevación convexa, bordes ondulados y formas circulares (Figura 3.1),

establecidas por microorganismos en forma de bacilos cortos Gram negativos (Figura 3.3 y 3.5).

Tabla 3.3. Características fenotípicas de bacterias del género *Azotobacter* sp, aisladas de suelo rizosférico de *E. grandis*.

Cepa	Morfología				Microscopía		
	Forma	Borde	Elevación	Consistencia	Color	Forma	Tinción de Gram
AZT1	Amiboide	Ondulado	Convexa	Acuosa	Transparente	Bacilos cortos	Gram negativa
AZT2	Circular	Entero	Convexa	Acuosa	Café traslucido	Bacilos cortos	Gram negativa
AZT3	Amiboide	Ondulado	Elevada	Viscosa	Café/lechosa	Bacilos cortos	Gram negativa
AZT4	Circular	Ondulado	Elevada	Viscosa	Café/lechosa	Bacilos cortos	Gram negativa
AZT5	Circular	Ondulado	Convexa	Acuosa	Transparente	Bacilos cortos	Gram negativa
AZT6	Amiboide	Entero	Convexa	Acuosa	Café/lechosa	Bacilos cortos	Gram negativa
AZT7	Circular	Ondulado	Plana	Viscosa	Café/lechosa	Bacilos cortos	Gram negativa
AZT8	Circular	Entero	Elevada	Viscosa	Transparente	Bacilos cortos	Gram negativa

Tabla 3.4. Características fenotípicas de bacterias del género *Azospirillum* sp, aisladas de suelo rizosférico de *E. grandis*.

Cepa	Morfología				Microscopía		
	Forma	Borde	Elevación	Consistencia	Color	Forma	Tinción de Gram
AZP1	Amiboide	Ondulado	Plana	Seca	Rojo	Bacilos cortos	Gram negativa
AZP2	Fusiforme	Ondulado	Plana	Viscosa	Rojo	Bacilos cortos	Gram negativa
AZP3	Circular	Ondulado	Elevada	Viscosa	Rojo escarlata	Bacilos cortos	Gram negativa
AZP4	Amiboide	Lobulado	Elevada	Viscosa	Rojo escarlata	Bacilos cortos	Gram negativa
AZP5	Circular	Entero	Plana	Seca	Rojo escarlata	Bacilos cortos	Gram negativa
AZP6	Amiboide	Ondulado	Elevada	Viscosa	Rojo escarlata	Bacilos cortos	Gram negativa
AZP7	Puntiforme	Entero	Plana	Seca	Rojo escarlata	Bacilos cortos	Gram negativa
AZP8	Circular	Entero	Elevada	Viscosa	Rojo escarlata	Bacilos cortos	Gram negativa

En la Tabla 3.4, se observan las características morfológicas a nivel colonia de las bacterias en placa y las características microscópicas de ocho cepas de bacterias del género *Azospirillum* sp aisladas en medio de cultivo Rojo Congo identificadas como AZP, los aislados predominantes se caracterizaron por ser colonias viscosas, con elevación plana, bordes ondulados y formas amiboides y circulares (Figura 3.2), establecidas por microorganismos en forma de bacilos cortos Gram negativos (Figura 3.4 y 3.6). Esta heterogeneidad en las características morfológicas, muestra que en el suelo cultivado con *E. grandis* existe gran diversidad de bacterias benéficas. Las cepas presentaron características morfológicas propias de cada género diazotrófico según describen Garrity *et al.* (2006) y Madigan *et al.* (2012). Cabe señalar, que la densidad y diversidad de microorganismos son susceptibles a variar dependiendo de la especie vegetal,

edad y estado nutricional de la planta, de las características fisicoquímicas del suelo, de su manejo y de las condiciones ambientales (Marschner *et al.*, 2004; Reyes & Valery, 2007; Obando *et al.*, 2010).

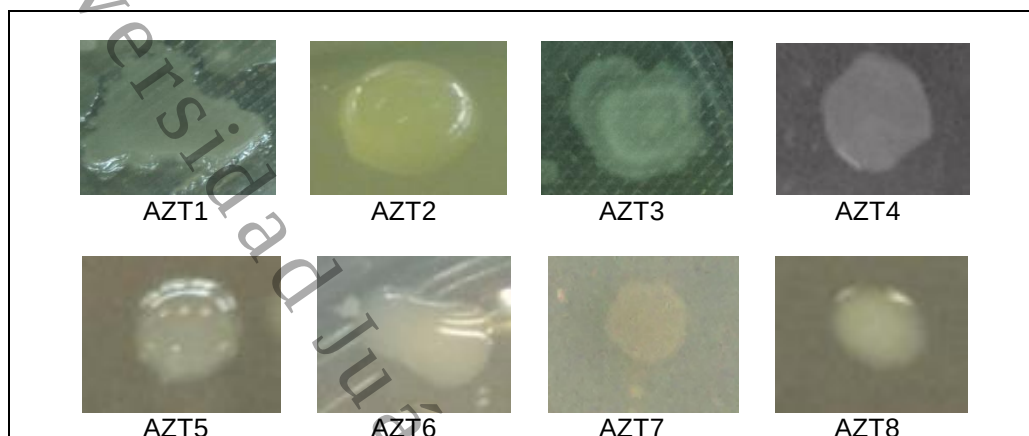


Figura 3.1. Morfología de las colonias de *Azotobacter* sp en placa, medio de cultivo Ashby.

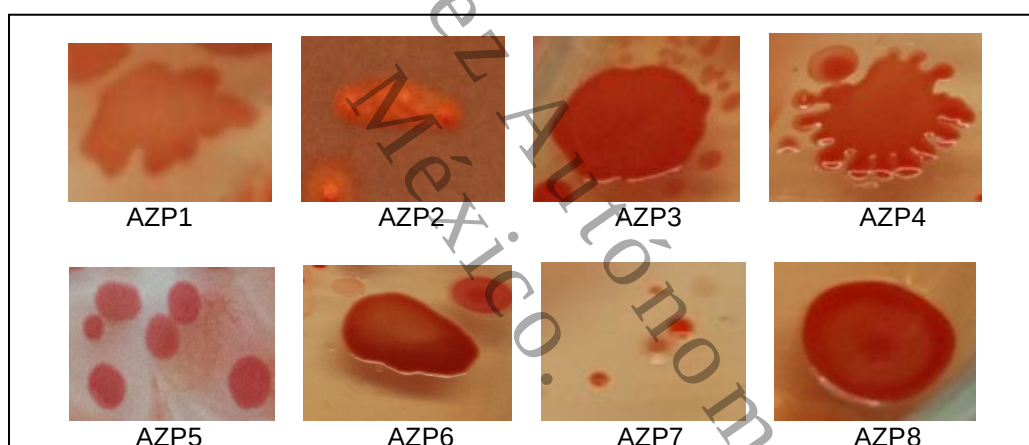


Figura 3.2. Morfología de las colonias de *Azospirillum* sp en placa, medio de cultivo Rojo Congo.

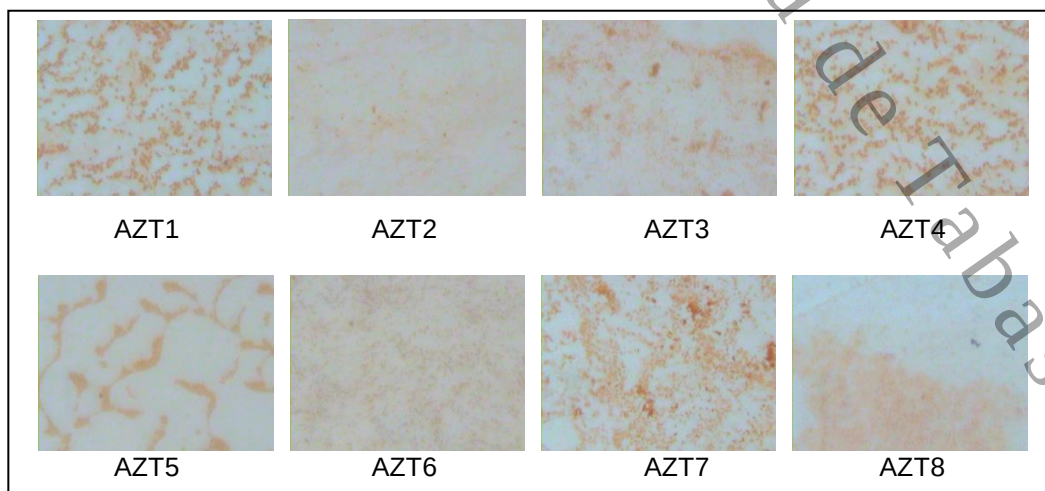


Figura 3.3. Micrografías de microscopía óptica. Tinción de Gram de bacterias *Azotobacter* sp.

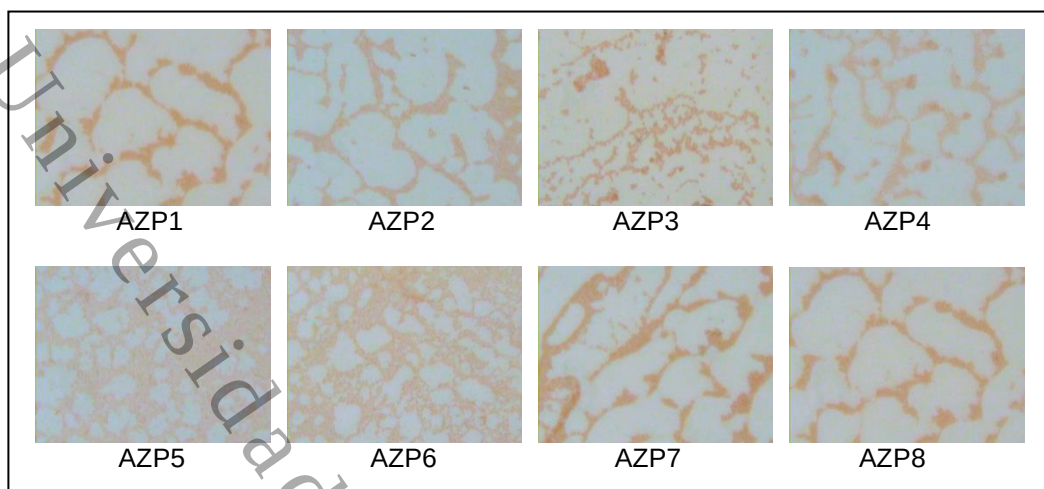


Figura 3.4. Micrografías de microscopía óptica. Tinción de Gram de bacterias *Azospirillum* sp.

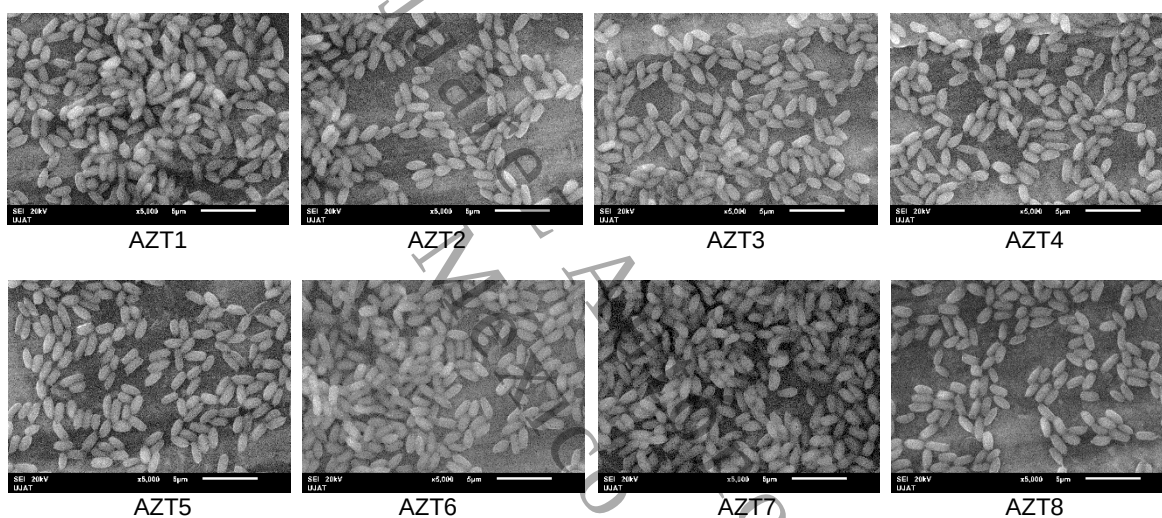


Figura 3.5. Micrografías de microscopía electrónica de barrido. Morfología de bacterias *Azotobacter* sp.

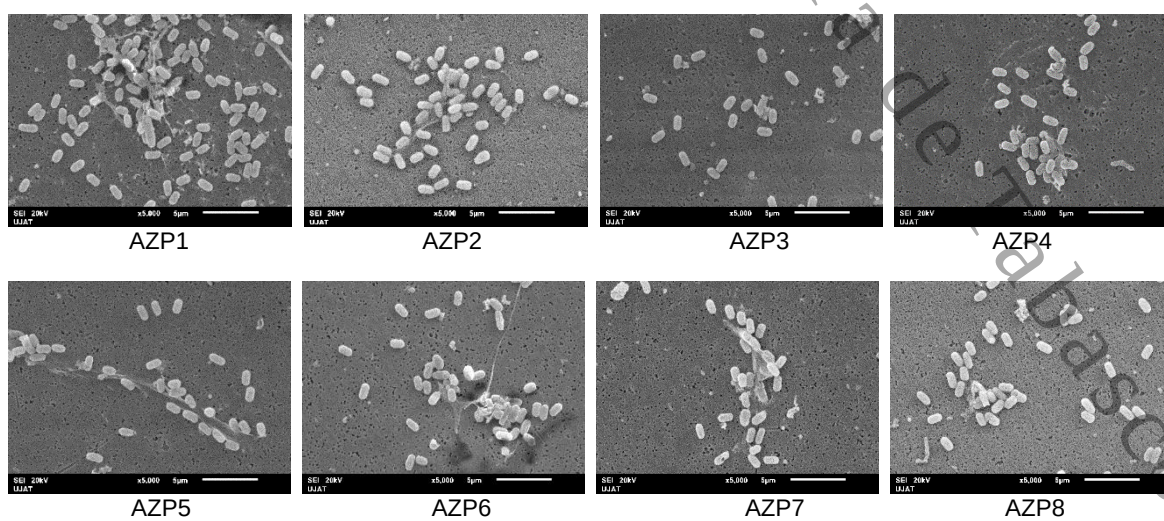


Figura 3.6. Micrografías de microscopía electrónica de barrido. Morfología de bacterias *Azospirillum* sp.

3.3 Producción de ácido indolacético (AIA)

La selección de los microorganismos estuvo en función de la mayor producción de auxinas, que son un grupo de fitohormonas que actúan como reguladoras del crecimiento vegetal. Dentro de las especies que han sido reportadas como las mayores productoras de AIA se encuentran *Azospirillum brasilense* (20 mg·mL⁻¹), *Azospirillum lipoferum* (16-32 mg·mL⁻¹), *Rhizobium* sp (22 mg·mL⁻¹), *Xanthomonas* sp (22 mg·mL⁻¹), *Pseudomonas* sp (20-65 mg·mL⁻¹), *Azotobacter* sp (>22 mg·mL⁻¹), *Acinetobacter* sp (3-18 mg·mL⁻¹), *Bacillus* sp (30-40 mg·mL⁻¹), *Corynebacterium* sp y *Flavobacterium* sp (20-30 mg·mL⁻¹) (Taller & Wong, 1989).

Algunos autores han demostrado que la inoculación con microorganismos productores de auxinas, tiene efectos benéficos sobre el crecimiento, germinación y la estimulación en el enraizamiento de Eucalyptus, (Dunstan *et al.*, 1998; Gonçalves *et al.*, 2007; Díaz, *et al.*, 2009; Puente *et al.*, 2010; Karthikeyan & Sakthivel 2011; Díaz *et al.*, 2012).

La producción de auxinas del tipo AIA promueve el crecimiento y desarrollo de las plantas, además se ha demostrado que la influencia de este metabolito en el desarrollo y las funciones de la raíz en plantas inoculadas, es probablemente uno de los factores de mayores beneficios para los cultivos, pudiendo desempeñar una función vital en los efectos obtenidos en plantas colonizadas (Patten & Glick, 2002; Spaepen *et al.*, 2007). Al respecto Díaz *et al.* (2012), definen que la capacidad de algunas bacterias para aumentar el enraizamiento, fibrosidad y la biomasa de las plantas de Eucalyptus puede depender de los niveles endógenos de AIA en la planta y los producidos por las respectivas bacterias. Así mismo, el estímulo de enraizamiento en Eucalyptus, podría estar relacionado con la acción de uno o varios mecanismos tales como la producción de auxinas y sideróforos, y también podrían estar asociados con la capacidad de las bacterias para permanecer en la rizósfera o en tejidos radiculares de la planta. En la Tabla 3.5 se observan los resultados de la cuantificación del AIA. El rango de concentraciones varió desde 10.8 µg·mL⁻¹ hasta 40.15 µg·mL⁻¹ para *Azotobacter* sp y 7.85 µg·mL⁻¹ hasta 42.8 µg·mL⁻¹ para *Azospirillum* sp, donde las cepas AZP1, AZP2, AZP5, AZT1, AZT3 y AZT4 fueron las mayores productoras.

Tabla 3.5. Producción de AIA por BFN de los géneros *Azospirillum* sp y *Azotobacter* sp.

Cepa	Producción de AIA ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)	
	<i>Azotobacter</i>	<i>Azospirillum</i>
1	40.15	42.8
2	10.8	39.1
3	31.40	21.25
4	34.3	7.85
5	16.35	40.7
6	17.2	20.1
7	14.3	13.97
8	14.95	15.175

Los valores de auxinas son comparables con los obtenidos por Obando *et al.* (2010), al estudiar bacterias diazotróficas de los géneros *Azotobacter*, *Beijerinckia*, *Derxia*, *Azospirillum*, *Herbaspirillum*, *Gluconacetobacter* y *Burkholderia* en eucalipto, con valores de AIA de $4 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ a $49.57 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$. Los resultados obtenidos son mayores a los reportados por Díaz *et al.* (2012) al estudiar rizobacterias asociadas a *Eucalyptus Globulus*, con $13.53 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ y $23.6 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ de AIA sintetizado por *Bacillus subtilis* y *Stenotrophomona maltophilia*, respectivamente, y a los obtenidos por Angulo *et al.* (2014), quienes reportan valores de $4.99 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ hasta $28.09 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ de AIA sintetizado por rizobacterias de los géneros *Arthrobacter*, *Lysinibacillus*, *Rahnella* y *Bacillus* aisladas de la rizósfera de *Eucalyptus nitens*. Se deduce que una mayor producción de exudados radiculares secretados por *Eucalyptus grandis*, estimularon una mayor población de microorganismos del género *Azotobacter* sp y *Azospirillum* sp, induciendo en estas bacterias alta producción de fitohormonas, especialmente del ácido indolacético. Los resultados permitieron seleccionar tres cepas de *Azospirillum* sp (AZP1, AZP2, AZP5) y tres cepas de *Azotobacter* sp (AZT1, AZT3, AZT4), para la obtención de los consorcios de BFN que se utilizaron para inocular los sustratos orgánicos.

3.4. Características químicas y biológicas de biofertilizantes durante el tiempo de incubación

En las unidades experimentales de los bioensayos para la formulación de los biofertilizantes BIO-AZP y BIO-AZT (Tabla 2.3 y 2.4) se monitorearon el pH, carbono orgánico (CO), nitrógeno total (N_T) y unidades formadores de colonias

(UFC) de *Azospirillum* sp y *Azotobacter* sp, respectivamente, en tres tiempos. Los muestreos y análisis se realizaron al inicio del proceso (día 1), durante el proceso (día 30) y al final del proceso (día 60), para estudiar la dinámica de las variables y seleccionar el tiempo óptimo para la producción de los biofertilizantes BIO-AZP y BIO-AZT.

3.4.1 pH en tratamientos

En el Anexo A13 se muestran los resultados del análisis de varianza ($p \leq 0.05$) del pH de BIO-AZP y BIO-AZT en tres tiempos (días 1, 30 y 60). Cabe señalar, que después de la inoculación con *Azospirillum* sp y *Azotobacter* sp se observaron efectos significativos entre medias de las observaciones del pH a través del tiempo. En la Figura 3.7 se observa que el pH en BIO-AZP y BIO-AZT se encuentra en el límite de confianza de 6.3391 ± 0.0937 y 6.2899 ± 0.1546 , respectivamente.

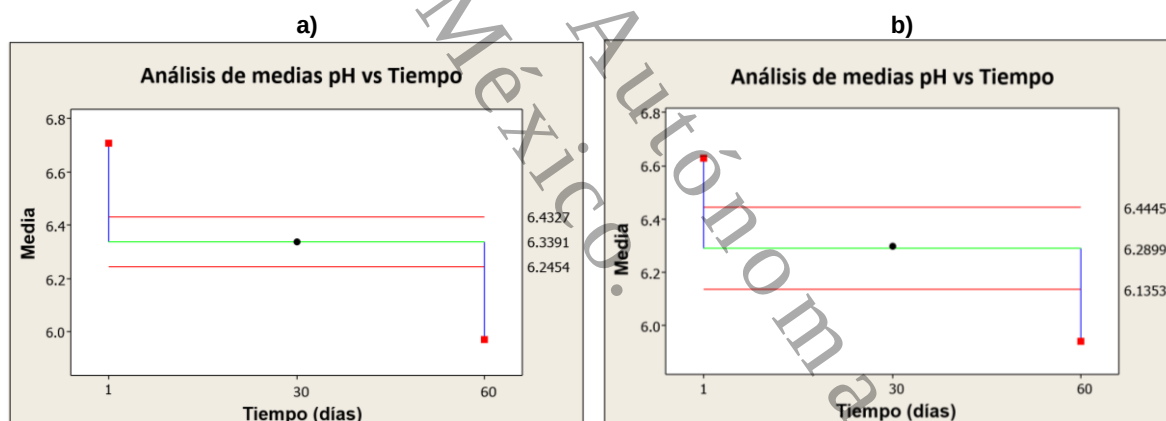


Figura 3.7. Análisis de medias del pH en tres tiempos, a) BIO-AZP, b) BIO-AZT. ($p \leq 0.05$).

Las diferencias significativas de esta variable a través del tiempo, están relacionadas con el proceso de mineralización de la materia orgánica, ya que durante el proceso de descomposición de la materia orgánica se observan tres fases: fase mesófila inicial, al final de la cual se producen ácidos orgánicos; fase termófila y fase mesófila final, considerándose finalizado el proceso cuando se llega a la temperatura inicial y se estabilizan a temperatura ambiente (Sánchez *et al.*, 2001; Sundberg *et al.*, 2004). Al respecto Borda *et al.* (2011), mencionan que un marcado descenso en el pH de biofertilizantes a través del tiempo puede

explicarse por la presencia de ácidos orgánicos solubles generados en el proceso de mineralización y el ácido carbónico formado por la liberación de CO₂.

En este sentido, el efecto de acidificación del medio puede deberse a la acción de los ácidos orgánicos producidos por los microorganismos, que resulta benéfica porque propicia la solubilización de fosfatos del medio por mecanismos de quelación y reacciones de intercambio (Vessey 2003; Rojas & Moreno 2008; Borda *et al.*, 2009). Cabe destacar que los niveles de pH se encuentran dentro de los límites adecuados en que éstas bacterias son capaces de sobrevivir (4.8-8.5) (Garrity *et al.*, 2006), además de estar adaptadas al suelo moderadamente ácido (5.17) característico del cultivo de eucalipto del que fueron aisladas. Al respecto, Alfonso *et al.* (2005) mencionan que la efectividad en el uso de microorganismos se logra cuando se dan las condiciones óptimas para metabolizar los sustratos, como pH, disponibilidad de agua, oxígeno y temperatura, así como la disponibilidad de fuentes energéticas, mientras que Reyes y Valery (2007) mencionan que el flujo de la biomasa microbiana del suelo está determinado por el pH y el carbono orgánico presente en el medio.

Los valores obtenidos de pH, son comparables con los reportados por Rivera *et al.* (2010), con valores de 6.3, en biofertilizantes a base de estiércol de pollo inoculados con bacterias *Azospirillum* sp, *Azotobacter* sp y bacterias solubilizadoras de fósforo, que mostraron valores mayores con respecto a los biofertilizantes a base de cáscara de naranja y cachaza. Y a los reportados por Rivera *et al.* (2011), con valores de 6.7-6.82, en biofertilizantes a base de estiércol de pollo y consorcios de bacterias *Azospirillum* sp, *Azotobacter* sp y solubilizadoras de fosfato. De acuerdo a la clasificación que hace la NOM-021-SEMARNAT-2000, los valores de pH se clasifican como neutro en el tiempo inicial y moderadamente ácido en el tiempo medio y final, para ambos biofertilizantes, considerados estos últimos como óptimos para el desarrollo de plántulas de eucalipto (5.5-7.5) y para los microorganismos inoculados (4.8-8.5) (FAO, 1981; NAS, 1983; Gelfius, 1994; Garrity *et al.*, 2006). Al respecto, Porta *et al.* (1999) mencionan que a valores inferiores de 5.5 existe poca disponibilidad de

nutrimentos debido a la baja descomposición de la materia orgánica y por la escasa densidad de bacterias y hongos.

3.4.2 Carbono orgánico en tratamientos

En el Anexo A14 se muestran los resultados del análisis de varianza ($p \leq 0.05$) del porcentaje de carbono orgánico (CO) de BIO-AZP y BIO-AZT en tres tiempos (días 1, 30 y 60). Cabe señalar, que después de la inoculación con *Azospirillum* sp y *Azotobacter* sp se observaron efectos significativos entre medias de las observaciones del CO a través del tiempo.

En la Figura 3.8 se observa que el porcentaje de CO en BIO-AZP y BIO-AZT se encuentra fuera del límite de confianza de 44.620 ± 1.65 y 45.844 ± 1.409 , respectivamente, en el día 1 y 60, lo que significa que en estos dos tiempos el efecto fue altamente significativo, debido a la disminución de su valor, este efecto puede deberse a que las bacterias inoculadas en los sustratos orgánicos contribuyen en la degradación de moléculas orgánicas de origen vegetal y animal que son fuente de carbono necesaria para su crecimiento y de energía para sus funciones metabólicas (Rivera et al., 2010).

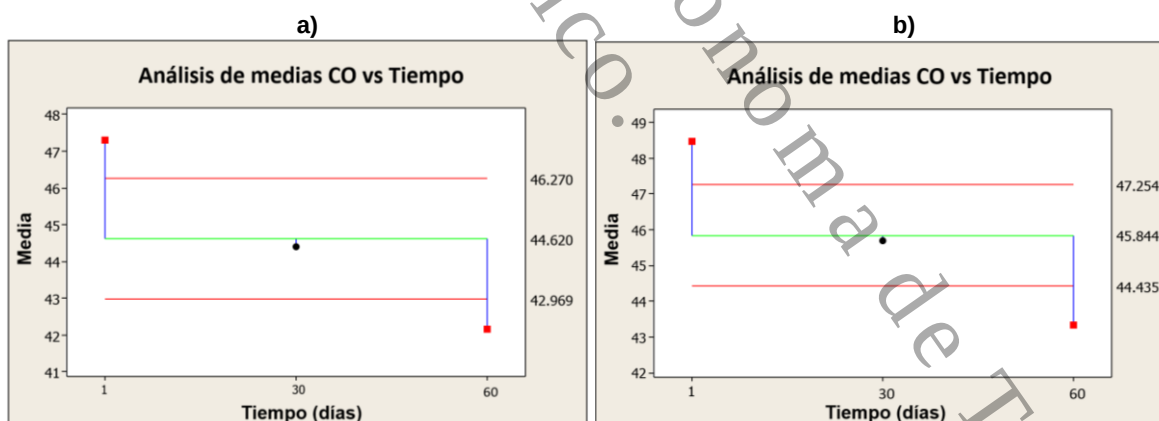


Figura 3.8. Análisis de medias del carbono orgánico (%) en tres tiempos, a) BIO-AZP, b) BIO-AZT. ($p \leq 0.05$).

Al respecto Zeng et al. (2007) y Córdova et al. (2009), mencionan que uno de los beneficios de los fertilizantes orgánicos es aumentar la provisión de la demanda de carbono, nitrógeno y energía para el crecimiento, reproducción, en la diversidad microbiana, hongos y en las PGPR, lo que le da un valor agregado a los productos elaborados a partir de residuos orgánicos.

Cabe destacar que durante la descomposición de la materia orgánica, los nutrientes orgánicos se convierten en formas inorgánicas disponibles para las plantas, esta conversión se conoce como mineralización. Guerrero *et al.* (2012), mencionan que en el proceso global de la mineralización de carbono se definen secuencialmente y alternativamente dos etapas fundamentales. La primera etapa corresponde al incremento en la actividad biológica y a la degradación por parte de los microorganismos de sustancias fácilmente biodegradables tales como azúcares, lípidos, fenoles, ácidos orgánicos, los cuales estimulan tanto el crecimiento como la respiración de un gran número de microorganismos, ya que son fuente de carbono y energía, de rápida utilización. La segunda etapa definida, está descrita por la disminución en la actividad biológica, como consecuencia de la disminución de las sustancias fácilmente biodegradables, provocando así su estabilización al final del proceso. Al respecto Isaza *et al.* (2009), mencionan que la mayor degradación de la materia orgánica se lleva a cabo en los primeros días del proceso, indicando la bioxidación de los compuestos más biodisponibles para los microorganismos. Mientras que la lenta degradación en los últimos días del proceso parece indicar el agotamiento de materiales de carbono simple, quedando compuestos con estructuras más complejas y de difícil transformación.

Los valores de carbono orgánico obtenidos, son comparables con los reportados por Rivera *et al.* (2010), con valores de 40.05%, 26.62% y 57.20%, en combinaciones de cáscara de naranja, cachaza y estiércol de pollo, respectivamente, inoculados con bacterias *Azospirillum* sp, *Azotobacter* sp y bacterias solubilizadoras de fósforo.

3.4.3 Nitrógeno total en tratamientos

En el Anexo A15 se muestran los resultados del análisis de varianza ($p \leq 0.05$) del porcentaje de nitrógeno total (N_T) de BIO-AZP y BIO-AZT en tres tiempos (días 1, 30 y 60). Cabe señalar, que después de la inoculación con *Azospirillum* sp y *Azotobacter* sp se observaron efectos significativos entre medias de las observaciones del N_T a través del tiempo.

En la Figura 3.9 se observa que el porcentaje de N_T en BIO-AZP y BIO-AZT, se encuentra fuera del límite de confianza de 3.699 ± 0.413 y 3.672 ± 0.391 , respectivamente, en el día 1 y 30, lo que significa que en estos dos tiempos el efecto fue altamente significativo, debido al aumento de su valor en los primeros treinta días de establecido el bioensayo, este resultado es similar al comportamiento de las unidades formadoras de colonias (UFC) (Figura 3.10), el efecto puede deberse principalmente a que el nitrógeno del estiércol se encuentra principalmente bajo forma orgánica y el proceso de mineralización realizado por los microorganismos determina su efectividad como fuente de nitrógeno disponible (Pino *et al.*, 2008).

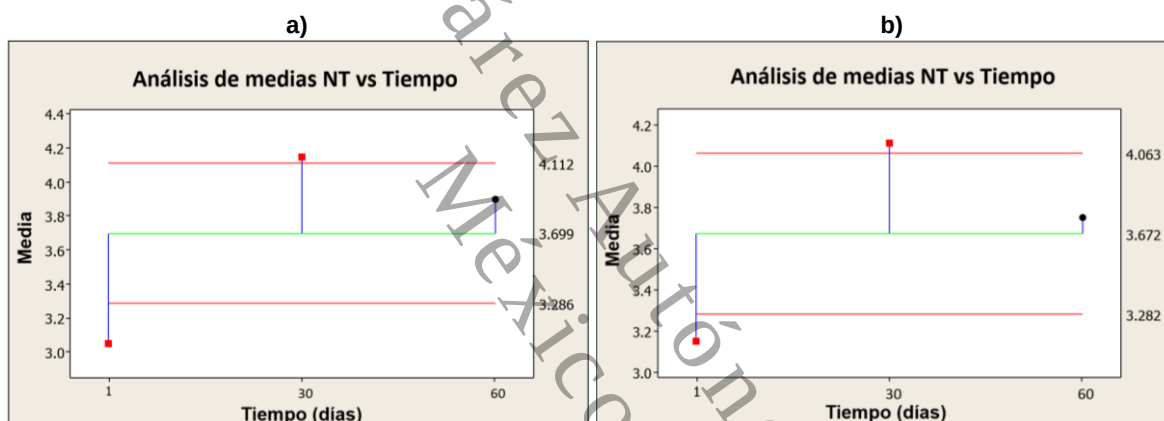


Figura 3.9. Análisis de medias del nitrógeno total (%) en tres tiempos, a) BIO-AZP, b) BIO-AZT. ($p \leq 0.05$).

Al respecto Bernal *et al.* (1998), mencionan que la concentración de nitrógeno incrementa por la fuerte degradación de los compuestos orgánicos presentes, lo cual reduce el peso del material degradado y concentra la cantidad de nitrógeno presente. Se observó un ligero decremento en el porcentaje de nitrógeno en el tiempo 3, esta pérdida de nitrógeno puede deberse a la volatilización de amoníaco (Madrid & Castellanos, 1998; Benito *et al.*, 2003). Este efecto también está relacionado con el comportamiento de las UFC, que decrecen significativamente hacia el día sesenta (Figura 3.10), que puede deberse a lo sustentado por Guerrero *et al.* (2012), quienes mencionan que la segunda etapa del proceso de mineralización de carbono se caracteriza por la disminución en la actividad biológica, como consecuencia de la disminución de las sustancias fácilmente

biodegradables, provocando así su estabilización al final del proceso. Sin embargo, los valores en el tiempo final se siguen clasificando como muy altos (>0.25) (SEMARNAT, 2002). Los valores de N_T obtenidos, son comparables con los reportados por Rivera *et al.* (2010), con valores de 1.2%, 3.2% y 5.2%, en combinaciones de cáscara de naranja, cachaza, estiércol de pollo, respectivamente, inoculados con bacterias *Azospirillum* sp, *Azotobacter* sp y bacterias solubilizadoras de fósforo, a sesenta días de establecido el bioensayo. También semejantes a los valores reportados por Córdova *et al.* (2009), con valores de 2.28% (en combinaciones de Pollinaza + Suelo + *Azospirillum* sp + *Azotobacter* sp) y 5.25% (en combinaciones de Pollinaza + *Azospirillum* sp + *Azotobacter* sp) a los sesenta días después de la incubación.

De acuerdo a la clasificación que hace la NOM-021-SEMARNAT-2000, los valores de N_T en ambos biofertilizantes, se clasifican como muy alto (>0.25) en los tres tiempos (SEMARNAT, 2002), este resultado puede deberse a que los sustratos orgánicos utilizados como acarreadores son ricos en proteínas y formas nitrogenadas de bajo peso molecular, como urea y ácido úrico (Zubillaga *et al.*, 2008). Al respecto Estrada (2005) menciona que los valores como abono del estiércol de pollo oscilan entre 1.1% a 5.5% de N_T , siendo más bajo para el estiércol fresco (1.1-1.6 % N_T) y más alto el estiércol desecado (3.6-5.5 % N_T).

Es muy conocido e importante que la riqueza en carbono y nitrógeno esté situada entre unos determinados valores, debido a que la microflora, que actúa en la descomposición y mineralización de la materia orgánica, requiere carbono como fuente de energía, y nitrógeno como intermediario en la síntesis de proteínas. La relación C/N es un factor que influye sobre la velocidad de descomposición de la materia orgánica fresca. Los residuos orgánicos, al descomponerse, proveen la energía para los microorganismos y nitrógeno que pasa a constituir nuevas células de los microorganismos del medio. El valor de la relación C/N al inicio del proceso fue de 17.24. La relación disminuyó considerablemente hasta el día 60, esto se dio principalmente durante la fase bio-oxidativa debido a la alta degradación de la materia orgánica (Benito *et al.*, 2003). A los treinta días la relación C/N fue de 12.33 y a los sesenta días fue de 12.94, cabe señalar que la tendencia a disminuir,

del tiempo medio al tiempo final, se vio afectada por la pérdida de nitrógeno en el tiempo final del proceso, aumentando el valor de esta relación. Resultados similares son reportados por Rivera *et al.* (2010), con un valor de 11 en la relación C/N, en combinaciones de estiércol de pollo inoculados con bacterias *Azospirillum* sp, *Azotobacter* sp y bacterias solubilizadoras de fósforo, a sesenta días de establecido el bioensayo. En este sentido, se puede considerar la relación C/N como un indicador en la estabilidad de los biofertilizantes, por lo que el tiempo medio de treinta días se postula como tiempo óptimo de incubación de los biofertilizantes.

3.4.4 Unidades formadoras de colonias en tratamientos

En el Anexo A16 se muestran los resultados del análisis de varianza ($p \leq 0.05$) de las unidades formadoras de colonias (UFC) de BIO-AZP y BIO-AZT en tres tiempos (días 1, 30 y 60). Cabe señalar, que después de la inoculación con *Azospirillum* sp y *Azotobacter* sp se observaron efectos significativos entre medias de las observaciones de las UFC a través del tiempo.

La Figura 3.10 refleja la curva de crecimiento de las poblaciones de *Azospirillum* sp y *Azotobacter* sp en BIO-AZP y BIO-AZT, respectivamente. Cabe señalar, que debido a lo espaciado de los conteos, en la curvas obtenidas no se definieron todas las etapas características de una curva de crecimiento microbiano como muestra la curva modelo en la Figura 3.10a; sin embargo, puede deducirse que en el periodo de tiempo comprendido entre el día uno y el día treinta de la etapa de incubación, tuvieron efecto tres fases características del crecimiento de las poblaciones microbianas: la fase de latencia, en donde el crecimiento no comienza inmediatamente; fase exponencial, en la cual el crecimiento es una consecuencia del hecho de que cada célula se divide para formar dos y así sucesivamente, además de que las células están en el estado fisiológico más sano y la fase estacionaria, en la que no hay aumento ni descenso neto en el número de células (Madigan *et al.*, 2012). Se sabe que si la incubación de microorganismos continúa después de que la población alcanzó la fase estacionaria, las células pueden permanecer vivas y metabólicamente activas; sin embargo, en la curva de

crecimiento se observó un decremento de las UFC después del día treinta, que es un indicativo de que las células entraron en fase de muerte (Madigan *et al.*, 2012). Estos resultados pueden estar relacionados con el decremento del carbono orgánico del día treinta hacia el día sesenta. Por lo que se considera que para el tercer tiempo, las condiciones no son las más propicias para la reproducción de los microorganismos inoculados sobre los sustratos orgánicos.

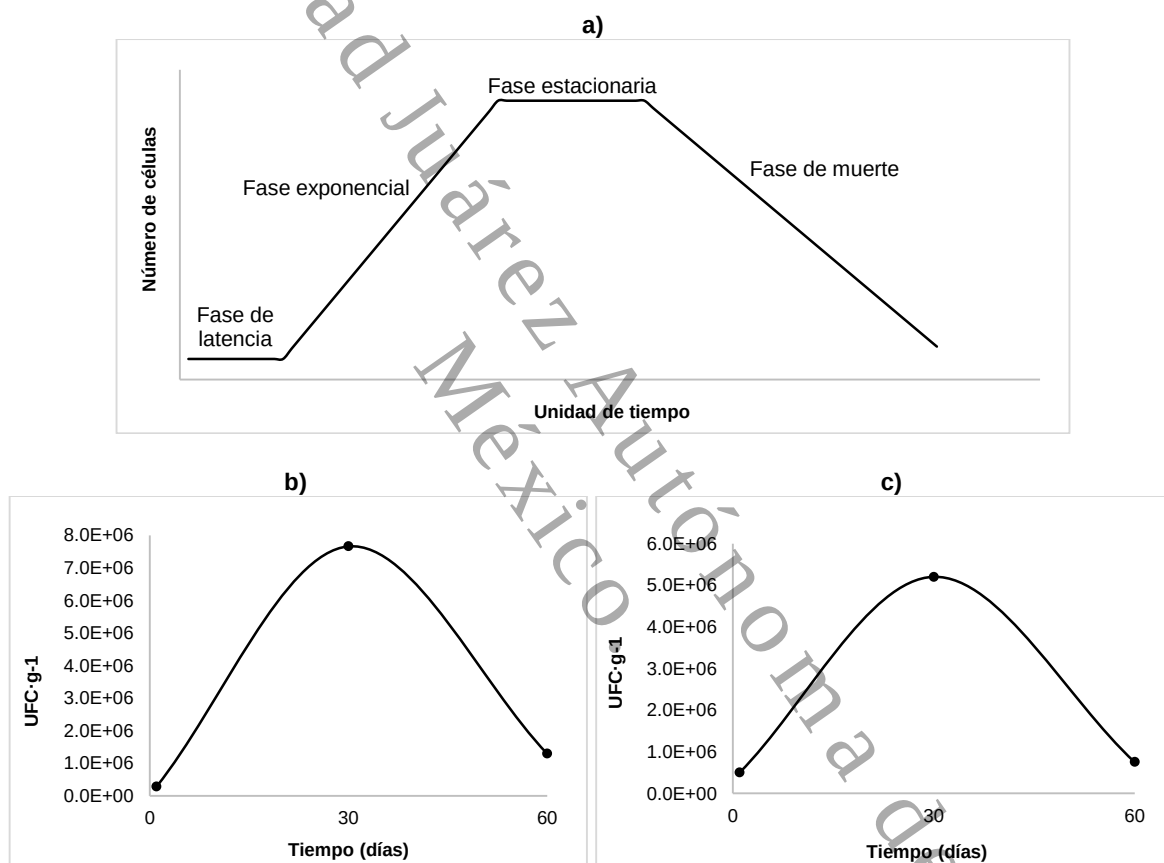


Figura 3.10. a) Curva modelo de crecimiento poblacional microbiano, b) Curva de crecimiento de *Azospirillum* sp en BIO-AZP, c) Curva de crecimiento de *Azotobacter* sp en BIO-AZT.

Este efecto puede estar relacionado con los resultados de los apartados anteriores, en los cuales se observa que a los sesenta días se ve afectada la demanda de carbono y nitrógeno, que de acuerdo a lo mencionado por diversos autores, son vitales para el crecimiento, reproducción y funciones metabólicas de los microorganismos (Zeng *et al.*, 2007; Córdova *et al.*, 2009; Rivera *et al.*, 2010). Esto debido a que en los primeros días del proceso de degradación de la materia

orgánica, hubo degradación de sustancias fácilmente biodegradables, los cuales estimularon tanto el crecimiento como la respiración de un gran número de microorganismos, mientras que para la etapa final del proceso se evidenció la disminución en la actividad biológica, como consecuencia de la disminución de las sustancias fácilmente biodegradables, provocando así su estabilización al final del proceso. Un efecto similar fue reportado por Córdova *et al.* (2009), quienes obtuvieron un decremento significativo del 77.49% (en combinaciones de Pollinaza + *Azospirillum* sp + *Azotobacter* sp) e incrementos bajos del 2.67% (en combinaciones de Pollinaza + *Azotobacter* sp) y 11.1 % (en combinaciones de Pollinaza + *Azospirillum* sp) en las unidades formadoras de colonias (UFC g⁻¹ suelo seco) del día treinta al día 60 de establecido el bioensayo, mientras que Rivera *et al.*, (2010) reportan menores densidades al utilizar soportes de origen animal y vegetal por separado, con densidades de *Azospirillum* sp (11x10³ UFC·g⁻¹ suelo seco) y de *Azotobacter* sp (32x10³ UFC·g⁻¹ suelo seco) en sustrato de cáscara de naranja y densidades de *Azospirillum* sp (48x10⁵ UFC·g⁻¹ suelo seco) y de *Azotobacter* sp (17x10⁵ UFC·g⁻¹ suelo seco) en sustrato de estiércol de pollo. En este sentido, la efectividad de los biofertilizantes BIO-AZP y BIO-AZT, integrados con residuos vegetales y estiércol de pollo se relacionó con su potencial para soportar el crecimiento y supervivencia de bacterias fijadoras de nitrógeno de los géneros *Azotobacter* sp y *Azospirillum* sp en función del tiempo, además del contenido de nitrógeno total. Con base a este criterio y a los resultados obtenidos, se observaron mejores características en el BIO-AZP y BIO-AZT en el tiempo medio (30 días), ya que de acuerdo al análisis de la curva de crecimiento, en este tiempo se alcanzó la fase estacionaria. Por lo que se procedió a realizar el análisis estadístico a los treinta días de incubación, para estudiar los efectos de los factores y niveles de los tratamientos, para seleccionar la mejor formulación de biofertilizantes y evaluarlos a nivel invernadero utilizando plántulas de *E. grandis* como cultivo indicador.

3.5 Efecto por nivel de los factores sobre las características químicas y biológicas de biofertilizantes

En el tiempo óptimo de producción de los biofertilizantes (30 días) se estudió el efecto por nivel de los factores sobre las variables respuesta (pH, CO, N_T, UFC) de los biofertilizantes BIO-AZP y BIO-AZT, para seleccionar la mejor formulación.

3.5.1 Efecto por nivel de los factores en el pH de tratamientos

El pH se vio afectado por los niveles de los factores, en la Tabla 3.6 se muestra el análisis de varianza ($p \leq 0.05$) del pH en tratamientos de BIO-AZP y BIO-AZT, a treinta días de incubación. Los resultados muestran que existen diferencias significativas para efectos simples de los factores (FN, FC y FS) y para la interacción doble de factores, pero no para la interacción triple de factores, en ambos biofertilizantes (Anexo A17).

Tabla 3.6. Análisis de varianza de pH por combinación de factores de a) BIO-AZP y b) BIO-AZT, a treinta días de incubación. ($p \leq 0.05$).

Fuente	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrados medios	F	P
a)					
Efectos principales	3	2.25967	0.753225	62.36	0.000
2-Interacciones	3	0.34738	0.115792	9.59	0.000
3-Interacciones	1	0.00005	0.000050	0.00	0.949
Error Residual	24	0.28990	0.012079		
Error Puro	24	0.28990	0.012079		
Total	31	2.89700			
S = 0.109905, R ² = 89.99%, R ² (aj) = 87.07%					
b)					
Efectos principales	3	3.34841	1.11614	126.43	0.000
2-Interacciones	3	0.62343	0.20781	23.54	0.000
3-Interacciones	1	0.01403	0.01403	1.59	0.22
Error Residual	24	0.21187	0.00883		
Error Puro	24	0.21187	0.00883		
Total	31	4.19775			
S = 0.0939581, R ² = 94.95%, R ² (aj) = 93.48%					

La observación de los efectos simples y de las interacciones, permitió estudiar el efecto de los niveles y factores del diseño experimental para la formulación de los biofertilizantes sobre el pH de los tratamientos, a través de un modelo estadístico. El análisis de varianza para cada una de las fuentes permitió establecer si el factor considerado ejerció efecto sobre la respuesta, en este sentido los modelos para BIO-AZP y BIO-AZT tomaron en cuenta sólo los efectos simples e interacciones

dobles, por tener significancia estadística ya que afectaron el comportamiento de la variable respuesta (Tabla 3.6). A partir de estos resultados, se construyó un modelo de superficie de respuesta, a través del cual se obtuvo la expresión matemática que representa la respuesta del sistema (pH: variable dependiente) en función de los factores FN, FC y FS (variables independientes). Las ecuaciones correspondientes a los modelos de superficie para la respuesta pH en BIO-AZP (Ec. 3.1) y BIO-AZT (Ec. 3.2), se agrupan de la siguiente manera:

$$\text{pH}_{(\text{BIO-AZP})} = 7.55000 + 0.00643750\text{FN} - 0.00395000\text{FC} - 0.0131250\text{FS} - 1.12500\text{E-}06(\text{FNFC}) - 4.70000\text{E-}05(\text{FNFS}) + 3.42500\text{E-}05(\text{FCFS}) \dots\dots\dots \text{Ec.3.1}$$

$$\text{pH}_{(\text{BIO-AZT})} = 5.64500 + 0.01310\text{FN} - 0.00100\text{FC} - 0.007475\text{FS} - 1.17500\text{E-}05(\text{FNFC}) + 1.37500\text{E-}05(\text{FNFS}) + 3.17500\text{E-}05(\text{FCFS}) \dots\dots\dots \text{Ec.3.2}$$

Los modelos obtenidos permiten establecer las condiciones de mezcla inicial de sustratos orgánicos, para preparar biofertilizantes cuyo valor de la variable respuesta se repita (Carolla *et al.*, 2007).

En la Figura 3.11 se observa el efecto por nivel de los factores sobre el pH en los tratamientos BIO-AZP y BIO-AZT, el mayor valor de pH se alcanza con el nivel alto del factor fuente de nitrógeno FN (200g) y niveles bajos de los factores fuente de carbono FC (300g) y factor suelo FS (50g), mientras que los valores más bajos de pH se alcanzan con el nivel bajo de FN (100g) y niveles altos de FC (500g) y FS (100g).

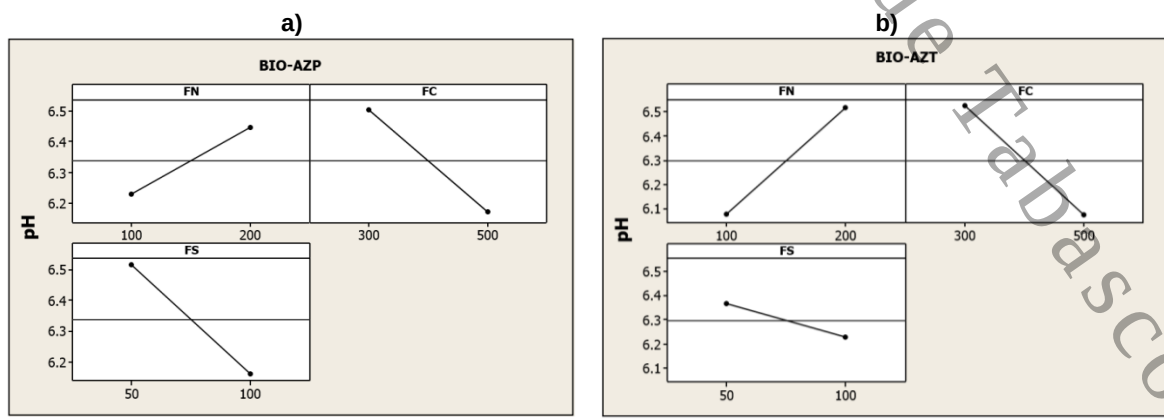


Figura 3.11. Efecto por nivel de los factores fuente de nitrógeno (FN), fuente de carbono FC y factor suelo (FS), sobre el pH de a) BIO-AZP, b) BIO-AZT, a treinta días de incubación.

El estudio del efecto por nivel de los factores fuente de nitrógeno (FN), fuente de carbono FC y factor suelo (FS), sobre el pH de tratamientos dio como resultado que los valores más altos de pH conciernen a las formulaciones BIO-AZP2 y BIO-AZT2 con valores de 6.94 y 6.99, respectivamente, que fueron elaborados con dosis altas de pollinaza (200g), este resultado posiblemente fue originado por la composición química de la pollinaza, ya que el pH del estiércol de pollo es alcalino debido a su alto contenido de amoníaco, de acuerdo a los resultados reportados por diversos autores su valor oscila entre 7.46 (González *et al.*, 2013), 7.38 (Córdova *et al.*, 2009), 8-9 (Estrada, 2005), 8 (Castellanos *et al.*, 2000). Se sabe que a pH muy altos se produce una gran pérdida de nitrógeno por volatilización de amoníaco (Benito *et al.*, 2003; Estrada, 2005; Arias, 2010). Al respecto, Castellanos *et al.* (2000), mencionan que la pérdida de proteína puede ser evitada mediante la acidificación de la pollinaza, y que acidificando las excretas a un valor de pH igual o menor de 6, esta pérdida se reduce. Los valores más bajos de pH corresponden a las formulaciones BIO-AZP7 y BIO-AZT7, con altos niveles de hojarasca y suelo del cultivo de eucalipto, que se caracterizan por ser moderadamente ácidos. En este sentido, la incorporación de soportes de pH complementario como la hojarasca y suelo del cultivo de eucalipto, redujeron considerablemente el valor de pH en los bifertilizantes.

3.5.2. Efecto por nivel de los factores en el carbono orgánico de tratamientos

El carbono orgánico (CO) se vio afectado por los niveles de los factores FN, FC y FS, en la Tabla 3.7 se muestra el análisis de varianza ($p \leq 0.05$) del CO en tratamientos de BIO-AZP y BIO-AZT, a treinta días de incubación. Los resultados muestran que existen diferencias significativas para efectos simples de los factores, pero no para la interacción doble y triple de factores, en ambos biofertilizantes (Anexo A18).

Tabla 3.7. Análisis de varianza del CO por combinación de factores de a) BIO-AZP y b) BIO-AZT, a treinta días de incubación. ($p \leq 0.05$).

Fuente	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrados medios	F	P
a)					
Efectos principales	3	425.81	141.937	15.11	0.000
2-Interacciones	3	67.00	22.334	2.38	0.095
3-Interacciones	1	12.03	12.030	1.28	0.269
Error Residual	24	225.48	9.395		
Error Puro	24	225.48	9.395		
Total	31	730.32			
S = 3.06514, $R^2 = 69.13\%$, R^2 (aj) = 60.12%					
b)					
Efectos principales	3	376.018	125.339	21.44	0.000
2-Interacciones	3	17.576	5.859	1.00	0.409
3-Interacciones	1	0.005	0.005	0.00	0.977
Error Residual	24	140.324	5.847		
Error Puro	24	140.324	5.847		
Total	31	533.923			
S = 2.41802, $R^2 = 73.72\%$, R^2 (aj) = 66.05%					

La observación de los efectos simples y de las interacciones, permitió estudiar el efecto de los niveles y factores del diseño experimental para la formulación de los biofertilizantes sobre el % CO de los tratamientos, a través de un modelo estadístico. El análisis de varianza para cada una de las fuentes permitió establecer si el factor considerado ejerció efecto sobre la respuesta, en este sentido los modelos para BIO-AZP y BIO-AZT tomaron en cuenta sólo los efectos simples, por tener significancia estadística ya que afectaron el comportamiento de la variable respuesta (Tabla 3.7). A partir de estos resultados, se construyó un modelo de superficie de respuesta, a través del cual se obtuvo la expresión matemática que representa la respuesta del sistema (%CO: variable dependiente) en función de los factores FN, FC y FS (variables independientes). Las ecuaciones correspondientes a los modelos de superficie para la respuesta %CO en BIO-AZP (Ec. 3.3) y BIO-AZT (Ec. 3.4), se agrupan de la siguiente manera:

$$\%CO_{(BIO-AZP)} = 62.8625 - 0.033363FN - 0.047975FC - 0.46875FS \dots \dots \dots \text{Ec. 3.3}$$

$$\%CO_{(BIO-AZT)} = 48.4613 + 0.044600FN + 0.0044375FC - 0.178400FS \dots \dots \dots \text{Ec. 3.4}$$

Los modelos obtenidos permiten evaluar el efecto de los factores en la variable respuesta %CO, producido a partir de los diferentes niveles de los factores FN, FC

y FS, estableciendo las condiciones de mezcla inicial de pollinaza, hojarasca y suelo, para preparar biofertilizantes cuyo valor de la variable respuesta se repita (Carolla et al., 2007).

En la Figura 3.12 se observa el efecto por nivel de los factores sobre el contenido de carbono orgánico (CO) en los tratamientos BIO-AZP y BIO-AZT, el mayor porcentaje de CO se alcanza con los niveles altos de los factores fuente de nitrógeno FN (200g) y fuente de carbono FC (500g) y nivel bajo del factor suelo FS (50g), mientras que los valores más bajos de CO se presentan en los niveles bajos de FN (100g) y FC (300g) y nivel alto de FS (100g).

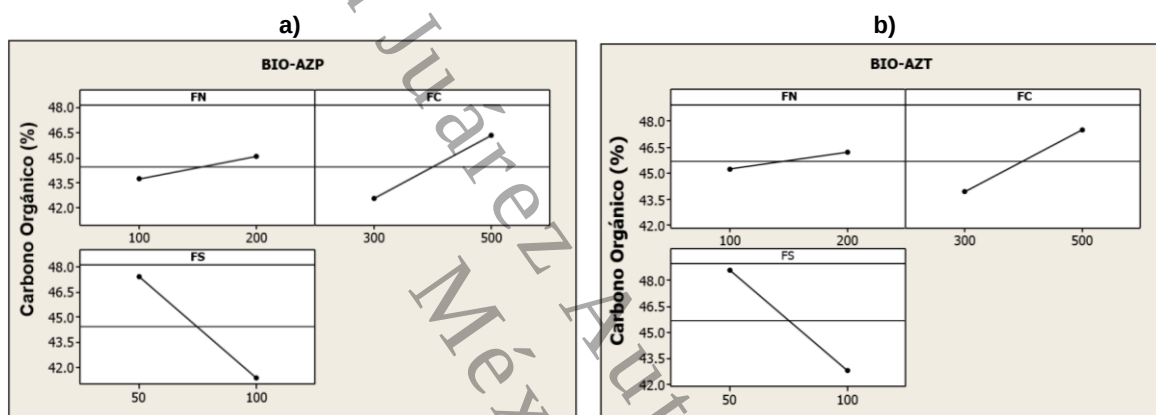


Figura 3.12. Efecto por nivel de los factores fuente de nitrógeno (FN), fuente de carbono FC y factor suelo (FS), sobre el contenido de carbono orgánico de a) BIO-AZP y b) BIO-AZT, a treinta días de incubación.

Los valores más altos de CO corresponden a las formulaciones BIO-AZP4 y BIO-AZT4 con 49.925% y 50.315 % de CO, respectivamente, mientras que los valores más bajos conciernen a las formulaciones BIO-AZP5 y BIO-AZT5 con 37.490% y 40.045% de CO. Cabe señalar que se esperaba este comportamiento, debido a la alta concentración de material orgánico presente en el BIO-AZP4 y BIO-AZT4, aportado por la pollinaza y la hojarasca (200 y 500 g, respectivamente), que fue un 75% mayor a la cantidad de pollinaza y hojarasca del BIO-AZP5 y BIO-AZT5 (100 y 300 g). Esta característica del BIO-AZP5 y BIO-AZT5, también fue consecuencia del alto contenido de suelo en su formulación (20%), ya que a pesar de que el suelo utilizado contiene 3.19 % de CO, es significativamente menor al CO aportado por el FN y FC. La pollinaza es un subproducto rico en materia orgánica compuesta de una mezcla de deyecciones y de un material absorbente, según datos reportados por diversos autores el porcentaje de CO de la pollinaza oscila

entre 17.94% (González *et al.*, 2013), 57.06% (Córdova *et al.*, 2009), 23% (Estrada, 2005). Al respecto Arias (2010) y Estrada (2005), mencionan que la composición y calidad de la pollinaza, puede variar debido a varios factores como el tipo de cama para los pollos (aserrín de madera, pasto seco, viruta, cascarilla de arroz o de soya, olote de maíz molido, etc.), tipo de alimento, cantidad de alimento desperdiciado, cantidad de plumas, edad de las aves, condiciones de ventilación y temperatura.

3.5.3. Efecto por nivel de los factores en el nitrógeno total de tratamientos

El nitrógeno total (N_T) se vio afectado por los niveles de los factores FN, FC y FS, en la Tabla 3.8 se muestra el análisis de varianza ($p \leq 0.05$) del N_T en tratamientos de BIO-AZP y BIO-AZT, a treinta días de incubación. Los resultados muestran que existe efecto significativo para efectos simples y para la interacción doble de factores, pero no para la interacción triple de factores, en ambos biofertilizantes (Anexo A19).

Tabla 3.8. Análisis de varianza del N_T por combinación de factores de a) BIO-AZP y b) BIO-AZT, a treinta días de incubación. ($p \leq 0.05$).

Fuente	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrados medios	F	P
a)					
Efectos principales	3	35.2339	11.7446	278.82	0.000
2-Interacciones	3	6.7250	2.2417	53.22	0.000
3-Interacciones	1	0.0200	0.0200	0.47	0.497
Error Residual	24	1.0110	0.0421		
Error Puro	24	1.0110	0.0421		
Total	31	42.9898			
S = 0.205239, $R^2 = 97.65\%$, R^2 (aj) = 96.96%					
b)					
Efectos principales	3	30.1868	10.0623	32.92	0.000
2-Interacciones	3	8.1128	2.7043	8.85	0.000
3-Interacciones	1	0.714	0.714	2.34	0.139
Error Residual	24	7.3352	0.3056		
Error Puro	24	7.3352	0.3056		
Total	31	46.3489			
S = 0.552843, $R^2 = 84.17\%$, R^2 (aj) = 79.56%					

La observación de los efectos simples y de las interacciones, permitió estudiar el efecto de los niveles y factores del diseño experimental para la formulación de los biofertilizantes sobre el $\%N_T$ de los tratamientos, a través de un modelo estadístico. El análisis de varianza para cada una de las fuentes permitió

establecer si el factor considerado ejerció efecto sobre la respuesta, en este sentido los modelos para BIO-AZP y BIO-AZT tomaron en cuenta sólo los efectos simples e interacciones dobles, por tener significancia estadística ya que afectaron el comportamiento de la variable respuesta (Tabla 3.8). A partir de estos resultados, se construyó el modelo de superficie de respuesta, a través del cual se obtuvo la expresión matemática que representa la respuesta del sistema (%N_T: variable dependiente) en función de los factores FN, FC y FS (variables independientes). Las ecuaciones correspondientes a los modelos de superficie para la respuesta %N_T en BIO-AZP (Ec. 3.5) y BIO-AZT (Ec. 3.6), se agrupan de la siguiente manera:

$$\% N_T \text{ (BIO-AZP)} = 7.28250 - 0.0132750FN - 0.00607500FC - 0.0390000FS + 2.02500E-05 (FNFC) + 0.000258500 (FNFS) - 2.70000E-05 (FCFS) \dots\dots \text{Ec. 3.5}$$

$$\% N_T \text{ (BIO-AZT)} = 0.38500 + 0.0236625FN + 0.0136750FC + 0.026100FS - 8.58750E-05 (FNFC) - 8.3000000E-05 (FNFS) - 2.18000E-04 (FCFS) \dots \text{Ec. 3.6}$$

Los modelos obtenidos permiten establecer las condiciones de mezcla inicial de sustratos orgánicos, para preparar biofertilizantes cuyo aporte de N_T sea reproducible (Carolla *et al.*, 2007).

En la Figura 3.13 se observa el efecto por nivel de los factores sobre el N_T en los tratamientos BIO-AZP y BIO-AZT, el mayor porcentaje de N_T se alcanza con el nivel alto del factor fuente de nitrógeno FN (200g) y niveles bajos de los factores fuente de carbono FC (300g) y factor suelo FS (50g), mientras que los valores más bajos de N_T se presentan en el nivel bajo de FN (100g) y niveles altos de FC (500g) y FS (100g).

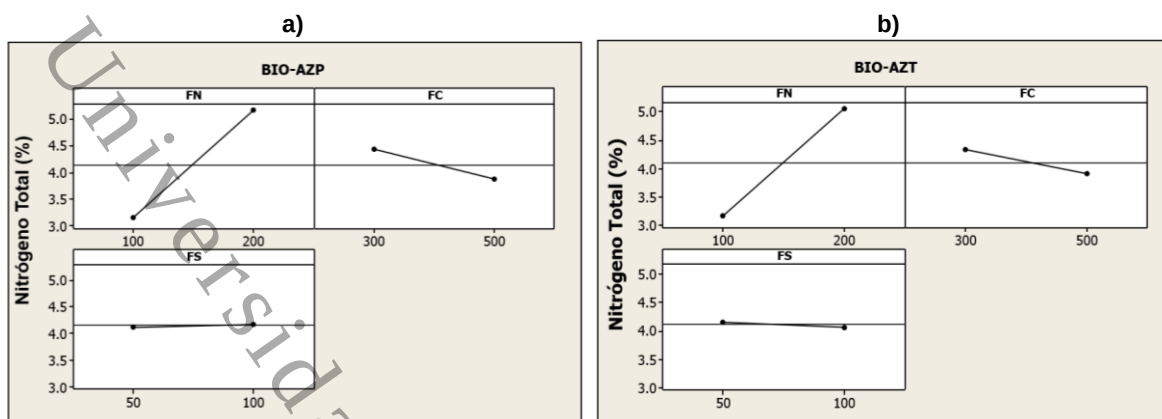


Figura 3.13. Efecto por nivel de los factores fuente de nitrógeno (FN), fuente de carbono FC y factor suelo (FS), sobre el nitrógeno total de a) BIO-AZP y b) BIO-AZT, a treinta días de incubación.

El estudio del efecto por nivel de los factores fuente de nitrógeno (FN), fuente de carbono FC y factor suelo (FS), sobre el N_T de tratamientos dio como resultado que los valores más altos de N_T corresponden a los tratamientos BIO-AZP6 y BIO-AZT6 con 5.680% y 5.648% de N_T , respectivamente. El comportamiento puede relacionarse a los altos contenidos de pollinaza presentes en el BIO-AZP6 y BIO-AZT6 que representa un 33.33% de la formulación. Esta respuesta puede asociarse con los hallazgos de Nahm (2003) quien afirma que el nitrógeno orgánico de la pollinaza tiene mayores contenidos de nitrógeno lábil procedente de las heces y orina, y que de acuerdo con Shriver et al. (2003) son originados por los altos contenidos protéicos de la dieta de los animales que contribuyen en la liberación de nitrógeno. De acuerdo a datos reportados por diversos autores, el porcentaje de N_T en la pollinaza oscila entre 2.98% (González et al., 2013), 3.8% (Córdova et al., 2009), 2.3% (Estrada, 2005).

3.5.4. Efecto por nivel de los factores en las unidades formadoras de colonias de tratamientos

El crecimiento de *Azospirillum* sp y *Azotobacter* sp se vio afectado por los niveles de los factores FN, FS y FC, en la Tabla 3.9 se muestra el análisis de varianza ($p \leq 0.05$) de las unidades formadoras de colonias (UFC) en tratamientos de BIO-AZP y BIO-AZT, a treinta días de incubación. Los resultados muestran que en BIO-AZP existe efecto significativo para efectos simples y para la interacción doble y triple de los factores (Anexo A20a). Mientras que en BIO-AZT existe efecto

significativo para efectos simples de los factores, pero no para la interacción doble y triple (Anexo A20b).

Tabla 3.9. Análisis de varianza de las UFC por combinación de factores de a) BIO-AZP y b) BIO-AZT, a treinta días de incubación. ($p \leq 0.05$).

Fuente	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrados medios	F	P
a)					
Efectos principales	3	4.36493E+14	1.45498E+14	12.49	0.000
2-Interacciones	3	3.34064E+14	1.11355E+14	9.56	0.000
3-Interacciones	1	9.43022E+13	9.43022E+13	8.10	0.009
Error Residual	24	2.79553E+14	1.16481E+13		
Error Puro	24	2.79553E+14	1.16481E+13		
Total	31	1.14441E+15			
S = 3412925, $R^2 = 75.57\%$, $R^2(\text{aj}) = 68.45\%$					
b)					
Efectos principales	3	8.79394E+13	2.93131E+13	7.13	0.001
2-Interacciones	3	3.64817E+13	1.21606E+13	2.96	0.053
3-Interacciones	1	2.93889E+11	2.93889E+11	0.07	0.791
Error Residual	24	9.86733E+13	4.11139E+12		
Error Puro	24	9.86733E+13	4.11139E+12		
Total	31	2.23388E+14			
S = 2027656, $R^2 = 55.83\%$, $R^2(\text{aj}) = 42.95\%$					

La observación de los efectos simples y de las interacciones, permitió estudiar el efecto de los niveles y factores del diseño experimental para la formulación de los biofertilizantes sobre las UFC de los tratamientos, a través de un modelo estadístico. El análisis de varianza para cada una de las fuentes permitió establecer si el factor considerado ejerció efecto sobre la respuesta, en este sentido los modelos para BIO-AZP tomaron en cuenta sólo los efectos simples e interacciones dobles y triples e los factores, y para BIO-AZT tomaron en cuenta sólo los efectos simples e interacciones dobles, por tener significancia estadística ya que afectaron el comportamiento de la variable respuesta (Tabla 3.8). A partir de estos resultados, se construyó un modelo de superficie de respuesta, a través del cual se obtuvo la expresión matemática que representa la respuesta del sistema (UFC: variable dependiente) en función de los factores FN, FC y FS (variables independientes). Las ecuaciones correspondientes a los modelos de superficie para la respuesta UFC en BIO-AZP (Ec. 3.7) y BIO-AZT (Ec. 3.8), se agrupan de la siguiente manera:

$$\text{UFC}_{(\text{BIO-AZP})} = -65633333 + 637000\text{FN} + 116667\text{FC} + 972667\text{FS} - 1013.33(\text{FNFC}) - 8006.67(\text{FNFS}) - 1760.00(\text{FCFS}) + 13.7333(\text{FNFCFS}) \dots \text{Ec. 3.7}$$

$$UFC_{(BIO-AZT)} = -5316667 + 76666.7FN + 47833.3FC - 9333FS..... Ec. 3.8$$

Los modelos obtenidos permiten evaluar el efecto de los factores en la variable respuesta UFC, producido a partir de los diferentes niveles de los factores FN, FC y FS. Al respecto, Carolla *et al.* (2007), mencionan que los modelos estadísticos resultan útiles, ya que son herramientas que permiten operacionalizar de una manera sencilla, la elaboración de abonos a partir de los desechos orgánicos.

En la Figura 3.14a se observa el efecto por nivel de los factores sobre las UFC en los tratamientos BIO-AZP, la mayor densidad bacteriana se alcanza con el nivel alto del factor fuente de nitrógeno FN (200g) y niveles bajos de los factores fuente de carbono FC (300g) y factor suelo FS (50g). En la Figura 3.14b se observa el efecto por nivel de los factores sobre las UFC en los tratamientos BIO-AZT, la mayor densidad bacteriana se alcanza con el nivel alto del factor fuente de carbono FC (500g) y niveles bajos de los factores fuente de nitrógeno FN (100g) y factor suelo FS (50g).

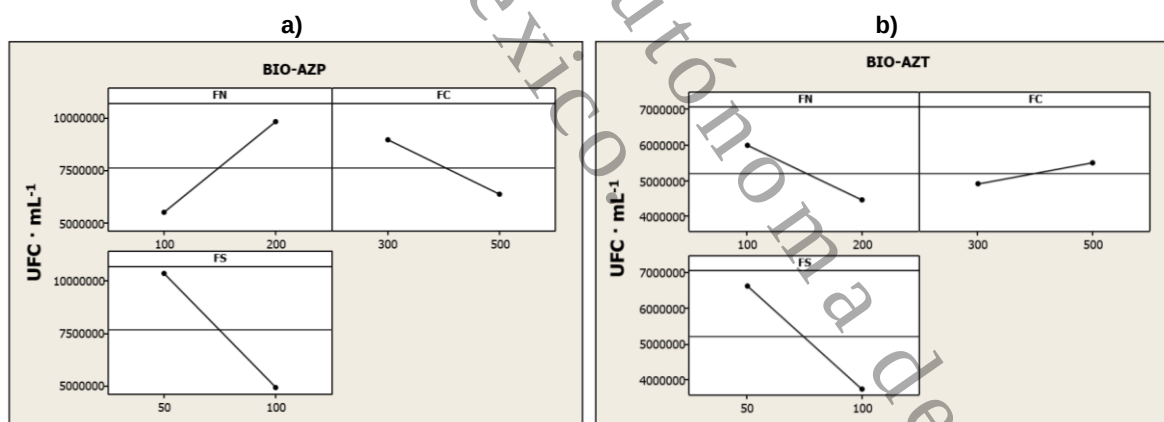


Figura 3.14. Efecto por nivel de los factores fuente de nitrógeno (FN), fuente de carbono FC y factor suelo (FS), sobre las unidades formadoras de colonias de a) BIO-AZP y b) BIO-AZT, a treinta días de incubación.

El estudio del efecto por nivel de los factores fuente de nitrógeno (FN), fuente de carbono FC y factor suelo (FS), sobre las UFC de tratamientos dio como resultado que la mayor densidad de bacterias la presentó el tratamiento BIO-AZP2 y BIO-AZT3 con 1.93×10^7 y 9.23×10^6 UFC·g⁻¹ suelo seco, respectivamente. Este comportamiento puede estar relacionado con los altos contenidos de carbono del BIO-AZP2 y BIO-AZT3, ya que la aplicación de los soportes orgánicos contenidos

en los biofertilizantes, aumentaron la materia orgánica como fuente de energía y el aporte de nutrimentos mediante la liberación de nitrógeno, potasio, calcio y magnesio (Redel *et al.*, 2006).

Los biofertilizantes formulados a partir de distintos niveles de pollinaza, hojarasca y suelo permitieron obtener altas densidades de UFC de *Azotobacter* sp y *Azospirillum* sp. En este sentido las formulaciones suman un balance adecuado entre la demanda de carbono y nitrógeno, que de acuerdo a lo mencionado por diversos autores, son vitales para el crecimiento, reproducción y funciones metabólicas de los microorganismos (Zeng *et al.*, 2007; Córdova *et al.*, 2009; Rivera *et al.*, 2010). Cabe señalar que el género *Azospirillum* sp se comportó como predominante con relación al género *Azotobacter* sp, según Alfonso *et al.* (2005) este resultado puede deberse a la amplia gama de hormonas vegetales que las bacterias *Azospirillum* sp exudan al medio, lo que les permite adaptarse y colonizar el ambiente con mayor facilidad.

En general, el efecto de los niveles y factores de los biofertilizantes BIO-AZP2 y BIO-AZT3 sobre las variables respuesta pH, CO, UFC y N_T, se relacionó con su capacidad de resistir el desarrollo y supervivencia de bacterias fijadoras de nitrógeno de los géneros *Azospirillum* sp y *Azotobacter* sp, y fueron seleccionadas como las mejores formulaciones de biofertilizantes para ser evaluadas en relación 1:1, y determinar su efecto sobre las variables dasométricas de plántulas de *E. grandis*.

3.6. Evaluación de los biofertilizantes en condiciones de invernadero

3.6.1 Altura inicial de plántulas de *E. grandis*

La altura inicial de las plántulas de *Eucalyptus grandis* seleccionadas como cultivos indicadores para las 24 unidades experimentales se muestra en la Figura 3.15, las características morfológicas fueron similares, esto para lograr la uniformidad en el crecimiento de las plántulas en el invernadero. La altura promedio de las plántulas por tratamiento fue de 10.88 cm (T1-BIO1), 10.73 cm (T2-BIO2), 11.80 cm (T3-BIO3), 11.85 cm (T4-BIO4), 11.63 cm (T5-FQ) y 11.40 cm (T6-T), con edad de 40 días en sistema de siembra suelo en vivero. Se seleccionaron plántulas vigorosas, por tener más reservas que ayudan a las

plantas a recuperarse de la reacción como consecuencia del trasplante en las unidades experimentales. Cabe destacar, que el análisis de varianza de la altura de plántulas no mostró diferencias estadísticas significativas (Tukey $p \leq 0.05$) (Anexo A21).

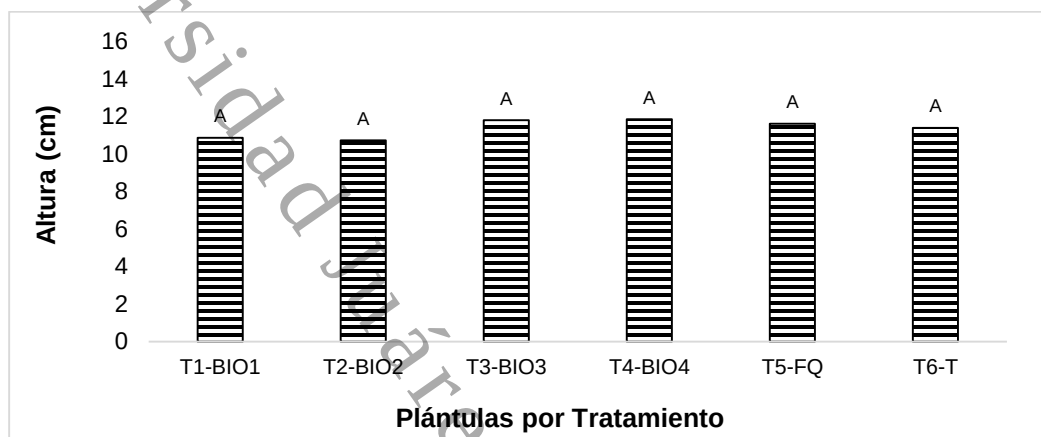


Figura 3.15. Altura inicial de plántulas de *Eucalyptus grandis*, a 40 días en sistema de siembra suelo en vivero. Letras diferentes sobre cada columna indican diferencias estadísticas entre medias de tratamientos (Tukey $p \leq 0.05$, A>B>C).

Con respecto al tamaño y calidad de las plántulas, el período de tiempo en vivero y el tamaño medio de la plántula al momento de la plantación, varían mucho de un país a otro. Según la FAO, cerca del Ecuador, se necesitan sólo 2 meses para obtener plantas de *Eucalyptus* de 25-30 cm de altura. En latitudes superiores a los 50°N, se requieren de 12 a 15 meses para obtener plantas de igual tamaño de especies resistentes al frío. En la mayor parte de las regiones tropicales y subtropicales, la altura media para la plantación varía de 15 a 30 cm y las plántulas de este tamaño pueden obtenerse en 4-5 meses. En zonas más áridas, con clima mediterráneo, se emplean muy a menudo plantas de 30-50 cm de altura, que requieren 6-10 meses de vivero (FAO, 1981). El eucalipto es una especie con periodos cortos de producción en vivero, la planta no debe salir demasiado suculenta, débil ni excesivamente endurecida. El periodo de producción varía entre 3 y 5 meses dependiendo de la especie, el tamaño de la planta debe oscilar entre 15-20 cm de altura al momento de la plantación (Klooster, 2000; Martínez et al., 2006). Las plántulas se establecieron en contenedores con distintas dosis de

biofertilizantes (Apartado 2.5) y se monitorearon sus características dasométricas durante 3.5 meses.

3.6.2 Variables dasométricas de plántulas de *E. grandis* en condiciones de invernadero

3.6.2.1 Altura

Los cambios en las medias de la variable altura de plántulas durante 105 días se observan en la Figura 3.16. Los tratamientos mostraron diferencias estadísticas significativas ($p \leq 0.05$) (Anexo A22). Las diferencias estadísticas fueron evidentes a partir del día sesenta, al respecto Rivera *et al.* (2010), mencionan que la ausencia de respuesta antes de los sesenta días posiblemente se deba a que la raíz de la plántula aún no alcanza a ponerse en contacto con el biofertilizante.

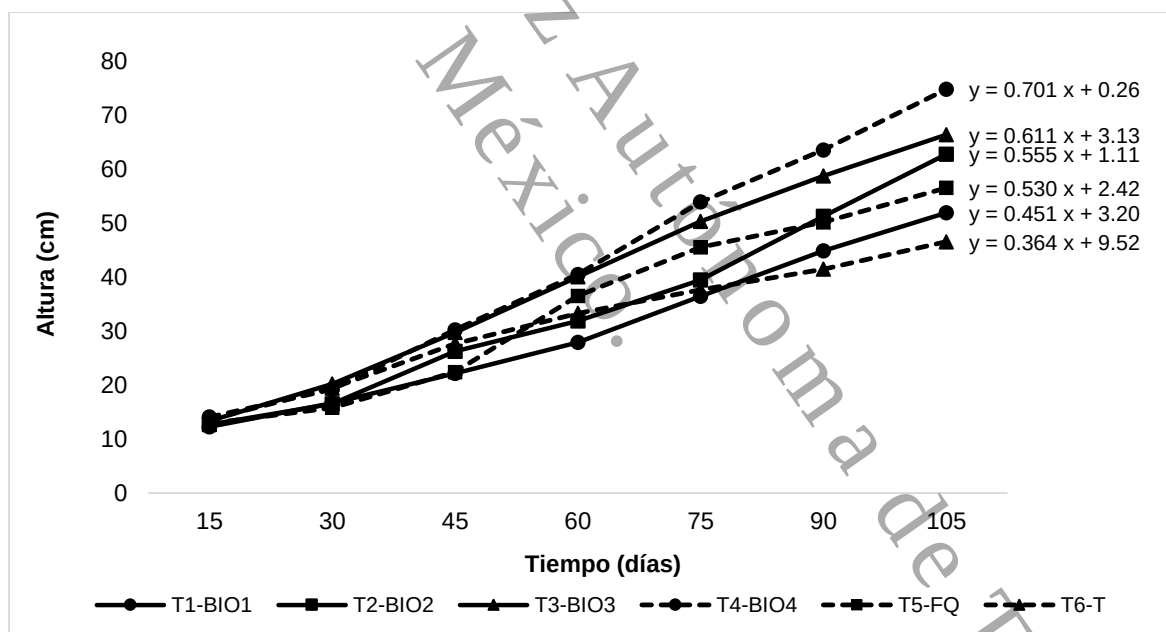


Figura 3.16. Dinámica de crecimiento de *E. grandis* durante 105 días de sembradas en macetas. T1-BIO1: Biofertilizante Dosis 1; T2-BIO2: Biofertilizante dosis 2; T3-BIO3: Biofertilizante dosis 3; T4-BIO4: Biofertilizante dosis 4; T5-FQ: Urea; T6-T: Testigo. x=Tiempo (días), y= Altura (cm).

El crecimiento de las plántulas mostró comportamiento lineal con respecto al tiempo, en la Figura 3.16 se observan las ecuaciones de regresión lineal para la altura de plántulas de *E. grandis* establecidas en invernadero, la pendiente define el aumento de la altura de las plántulas con respecto al tiempo, la pendiente más

grande correspondió al T4-BIO4, con plántulas que aumentaron su altura 0.701 cm por unidad de tiempo, mientras que la menor pendiente correspondió al tratamiento T6-T con plántulas de menor altura, debido que aumentó 0.364 cm por unidad de tiempo, misma que corresponde apenas al 51.9% de la mayor tasa de crecimiento alcanzada con el mejor tratamiento (T4-BIO4). Cabe destacar que la altura de las plántulas del T4-BIO4 fue 32.30% mayor que la altura de las plántulas fertilizadas químicamente con urea, correspondiente al tratamiento T5-FQ y 60.75% mayor que las plántulas del tratamiento testigo sin fertilización T6-T (Figura 3.17).



Figura 3.17. Plántulas de *E. grandis* después de 105 de establecidas en invernadero con biofertilizante nitrogenado a partir de *Azotobacter* sp y *Azospirillum* sp (T1-BIO1, T2-BIO2, T3-BIO3, T4-BIO4), fertilizante químico urea (T5-FQ) y sin fertilización (T6-T).

La estimulación del crecimiento no fue sobresaliente en las plántulas de los tratamientos T5-FQ y T6-T, esto se atribuye a las características de baja fertilidad del suelo del tratamiento T6-T y la falta de materia orgánica en el suelo de ambos tratamientos, no generaron un ambiente propicio para abastecer y suministrar los elementos químicos al suelo para ser absorbidos por las plántulas, además de reducir la densidad microbiana benéfica del suelo (García *et al.*, 2014). En este contexto, es importante mencionar que una forma de mejorar la calidad, fertilidad y productividad de los suelos, es agregar materia orgánica exógena a los mimos, estas adiciones de materia orgánica (de origen tan diverso como animal o vegetal) proporcionan materia orgánica lábil en cantidad suficiente como para estimular la vida de los microorganismos que pueden existir en el suelo, además de mejorar el

estado de los nutrimentos del suelo, sirviendo como una fuente de macro y micro elementos, mejorando sus propiedades físicas, mediante el aumento de la porosidad del suelo y la retención de agua (García *et al.*, 2014).

Por otro lado, la inhibición de la altura en el tratamiento T5-FQ, también puede deberse a las altas cantidades de nitrógeno en el suelo, lo cual es sabido que es un factor de estrés. Esta respuesta puede deberse a que la planta responde positiva o negativamente a condiciones de estrés que pueden provenir por cambios en temperatura, pH, cantidades tóxicas de elementos minerales y orgánicos en suelo (Salisbury & Ross, 2000). Otra causa asociada al bajo desarrollo de plántulas de *E. grandis* tratadas con urea puede deberse a los contenidos de sal que tiene este fertilizante químico, ya que tiene un índice de salinidad de 75.4 (expresa la relación del aumento de la presión osmótica de la solución del suelo, producida por el fertilizante), pues se ha observado que las soluciones salinas ejercen un efecto combinado, por un lado el efecto osmótico debido a la disminución del potencial hídrico del medio, que crea estrés en las plántulas (Bradford, 1995), y por otro lado, un efecto iónico por la entrada y/o acumulación de iones en la semilla que causa toxicidad (Dodd & Donovan, 1999; Gorai & Neffati, 2007). En este sentido, las principales causas de la inhibición del crecimiento bajo estas condiciones son el estrés osmótico y el efecto específico de los iones que incluye la toxicidad y el desbalance de los mismos (Öztürk *et al.*, 2006). Al respecto, Sánchez *et al.* (2008) señalan que el efecto nocivo del estrés inducido por las sales sobre plántulas produce retraso en la emergencia de plántulas, reducción del crecimiento de tallos, disminución del porcentaje de brotación, disminución del número de hojas, disminución de la longitud de la raíz y retardo en la maduración. Un estudio de las características biométricas (masa seca, crecimiento y diámetro) de plántulas de *Eucalyptus* sp bajo estrés salino realizado por Mendonça *et al.* (2007), demostró que el aumento de los niveles de sal (NaCl) reduce el crecimiento de *Eucalyptus camaldulensis*, *E. pellita* y *E. plántulas robusta*.

Por otro lado, existió una respuesta positiva por el uso de los biofertilizantes, las plántulas tratadas con el biofertilizante a base de *Azotobacter* sp y *Azospirillum* sp

en los tratamientos T1-BIO1, T2-BIO2, T3-BIO3 y T4-BIO4 mostraron crecimiento directamente proporcional a la cantidad adicionada y obtuvieron los mayores valores de altura. En la Figura 3.17 se observa el efecto benéfico del uso de biofertilizantes, ya que con su uso se obtuvieron plántulas vigorosas con mejores atributos dasométricos respecto a las fertilizadas químicamente y no fertilizadas, este resultado puede deberse a los mecanismos de fijación de nitrógeno y solubilización de fosfatos realizados por las bacterias, que promueven el crecimiento de las plantas (Reyes y Valery, 2007). Al respecto Zeng *et al.*, 2007; Córdova *et al.*, 2009 mencionan que uno de los beneficios de los fertilizantes orgánicos es aumentar la provisión de la demanda de carbono, nitrógeno y energía para el crecimiento, reproducción, en la diversidad microbiana, hongos y en las bacterias promotoras del crecimiento vegetal (PGPR).

Estudios realizados por Rivera *et al.* (2010) en naranjo agrio sometido a estiércol de pollo, cáscara de naranjo y cachaza mostraron resultados similares, pues al utilizar biofertilizantes indujeron una respuesta positiva en estos parámetros de crecimiento, comparado con un tratamiento testigo. Mientras que González *et al.* (2013) reportan que el uso de fertilizantes orgánicos a partir de estiércol de gallina estimula la altura de la plántula, favorece el aumento del diámetro basal de tallos, la materia seca foliar y radical, en plántulas del cítrico *Citrange troyer*, en condiciones de vivero. También estudios realizados por Slávik (2005) demostraron que la aplicación de bioestimulantes sobre el crecimiento del abeto rojo causó un efecto positivo, especialmente en diámetro y la altura.

Con el fin de mejorar la calidad de plántulas de eucalipto en la etapa de vivero, se ha utilizado una amplia gama de métodos de fertilización, desde la aplicación de diferentes dosis de fertilizantes químicos hasta la aplicación de inoculantes micorrízicos eficaces. Al respecto, Chen *et al.* (2006), estudiaron el efecto de la inoculación de *Eucalyptus urophylla* con esporas de *Escleroderma* en un vivero en el sur de China utilizando mezcla de vermiculita, turba y arena de río (2:1:2 v/v), la inoculación promovió el crecimiento de las plántulas y la adquisición de nutrientes, y aumentó el crecimiento de las plántulas en un 19-55% de altura de los brotes, en comparación con las plantas no inoculadas, estos autores reportan alturas de 31-

39 cm para plantas inoculadas y de 28 cm para plantas no inoculadas a cuatro meses de establecidas en vivero. Mason *et al.* (2000), estudiaron el crecimiento de plántulas de *Eucalyptus globulus* Labill inoculadas con hongos micorrízicos, durante un período inicial de doce semanas las plántulas se preinocularon con diez hongos micorrízicos diferentes y con nutrientes óptimos para fomentar el desarrollo de micorrizas, al final del experimento se encontraron diferencias significativas en el efecto de los hongos sobre el diámetro del tallo y materia seca, pero no en la altura, estos autores reportan alturas de 29.52-33.83 cm a doce semanas de establecidas en macetas y 63.8-79.4 cm a veinticuatro semanas. Monsalve *et al.* (2009), evaluaron el efecto de la aplicación de cuatro concentraciones de nitrógeno sobre atributos morfológicos, potencial de crecimiento y estatus nutricional de plántulas de *Eucalyptus globulus*, a diez semanas de establecidas en vivero las plántulas que alcanzaron mayor altura fueron las fertilizadas con 200 mg L⁻¹, con 45 cm. Por otro lado, Huang *et al.* (2013), realizaron un experimento para estudiar el impacto de la descomposición de hojas de *Cinnamomum septentrionale* en el crecimiento de plántulas de *Eucalyptus grandis*, para las plántulas del tratamiento testigo reportan alturas de 47 cm a los cuatro meses de establecidas en macetas y 54 cm a doce meses. Los resultados obtenidos en este estudio, son comparables con los reportados por Mason *et al.* (2000), quienes estimularon el crecimiento de plántulas de *Eucalyptus* con hongos micorrízicos y dosis de fósforo, reportando alturas en el rango de 63.8-79.4 cm, mientras que en nuestra investigación a los 105 días las plántulas biofertilizadas alcanzaron alturas en el rango de 51.8-74.75 cm, estos resultados ponen en evidencia efecto benéfico del uso de bacterias fijadoras de nitrógeno del género *Azotobacter* sp y *Azospirillum* sp, pues se ha demostrado que con su aplicación ayudan en la fijación del nitrógeno atmosférico, solubilizan y movilizan los nutrientes del suelo.

3.6.2.2 Diámetro de tallo

Los cambios en las medias de la variable diámetro de tallo de plántulas de eucalipto durante 105 días se observan en la Figura 3.18. Los tratamientos mostraron diferencias estadísticas significativas ($p \leq 0.05$) (Anexo A23). Las diferencias fueron notorias a partir del día cuarenta y cinco, al respecto Rivera *et al.* (2010), mencionan que la ausencia de respuesta en el crecimiento, en los primeros días del establecimiento de plantas con biofertilizantes, posiblemente se deba a que la raíz de la plántula aún no alcanza a ponerse en contacto con el biofertilizante.

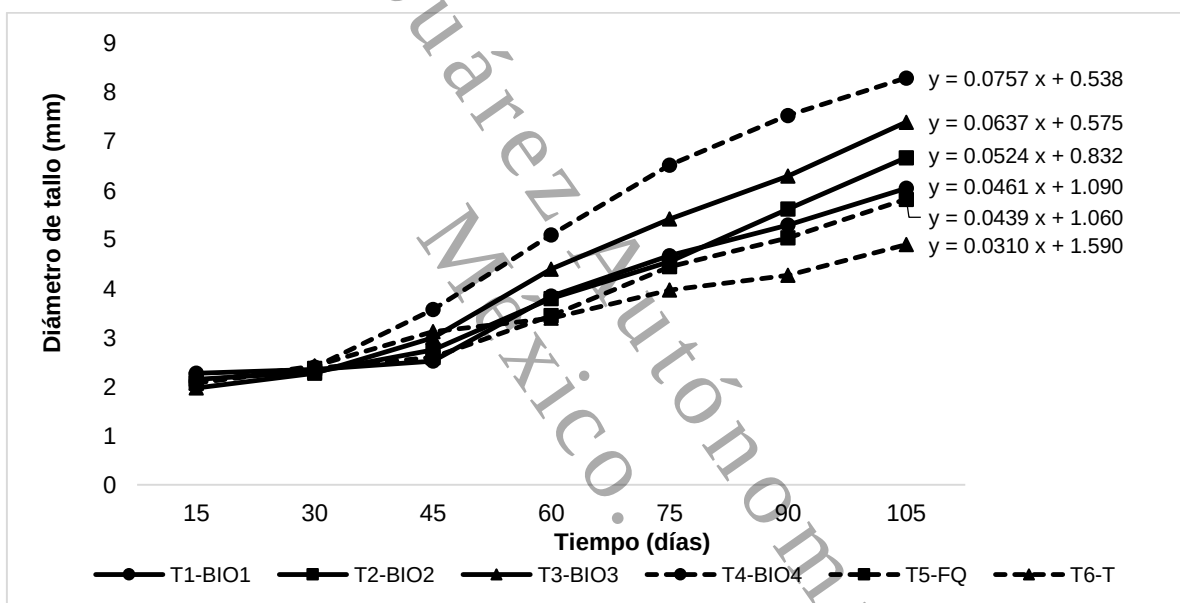


Figura 3.18. Dinámica de crecimiento de tallos de plántulas de *E. grandis* a 105 días de sembradas en macetas. T1-BIO1: Biofertilizante Dosis 1; T2-BIO2: Biofertilizante dosis 2; T3-BIO3: Biofertilizante dosis 3; T4-BIO4: Biofertilizante dosis 4; T5-FQ: Urea; T6-T: Testigo. x =Tiempo (días), y = Diámetro (mm).

El crecimiento del diámetro de tallo de las plántulas mostró un comportamiento lineal con respecto al tiempo, en la Figura 3.18 se observan las ecuaciones de regresión lineal para el diámetro de tallo de plántulas de *E. grandis* establecidas en vivero, la pendiente define el aumento del diámetro de tallo de las plántulas con respecto al tiempo, la pendiente más grande correspondió al T4-BIO4, con tallos que aumentaron su diámetro 0.0757 mm por unidad de tiempo, lo que significa que este tratamiento tuvo las plántulas con mayor diámetro de tallo al final del

periodo de evaluación, mientras que la menor pendiente correspondió al tratamiento T6-T, con tallos de menor diámetro, con aumentos de 0.0310 mm por unidad de tiempo. Este resultado corresponde al 40.95% respecto a la tasa de crecimiento del mejor tratamiento (T4-BIO4). Cabe destacar que el mayor diámetro se asoció con el tratamiento T4-BIO4 con un incremento del 42.4% y 69.3% respecto a las plántulas fertilizadas químicamente con urea del T5-FQ y las plántulas del tratamiento testigo sin fertilización T6-T, respectivamente (Figura 3.19).

La importancia del estudio del incremento del diámetro de tallo radica en que es un órgano que realiza funciones vitales como el sostén y transporte, ya que es la vía por la cual las sustancias se movilizan desde las raíces hacia las hojas y viceversa (Campbell & Reece, 2007; Curtis & Schnek, 2008). Varias especies de eucaliptos se plantan a nivel industrial para el aprovechamiento del tallo para la obtención de pulpa de papel y material de postería, la producción de madera justifica su interés económico, por lo general, entre 10 y 30 metros cúbicos por hectárea por año (Geilfus, 1994). La producción de plántulas de eucaliptos en vivero, permite seleccionar plántulas de calidad con mejores atributos morfológicos. La necesidad de descartar las plántulas deficientes en el vivero se aplica tanto en el eucalipto como en cualquiera otra especie para repoblación forestal. En este sentido, las características selectivas exigen que la plántula sea vigorosa, particularmente con altura adecuada y tallo recto, ya que estos atributos ofrecen seguridad al momento del trasplante definitivo. La plantación de eucalipto a raíz desnuda puede hacerse con buenos resultados solamente con plantas vigorosas, por lo que se utilizan plantas con un diámetro mínimo de 5 mm en el cuello radicular (FAO, 1981).



Figura 3.19. Tallos de plántulas de *E. grandis* después 105 días establecidas en invernadero con biofertilizante nitrogenado a partir de *Azotobacter* sp y *Azospirillum* sp (T1-BIO1, T2-BIO2, T3-BIO3, T4-BIO4), fertilizante químico urea (T5-FQ) y sin fertilización (T6-T).

Durante el periodo de evaluación se encontró que el tipo de biofertilizante y las dosis presentaron efectos significativos en el diámetro del tallo de las plántulas. Este parámetro aumentó cuando se incrementó la dosis de los biofertilizantes a base de BFN de los géneros *Azotobacter* sp y *Azospirillum* sp y sustratos orgánicos, mientras que las plántulas fertilizadas químicamente con urea y no fertilizadas (testigo) tuvieron los menores diámetros de tallo (Figura 3.19).

El efecto de la aplicación de biofertilizantes se relaciona con los altos contenidos de carbono orgánico y nitrógeno total de los sustratos (Figura 3.8 y 3.9), ya que el nitrógeno es un elemento esencial para las plantas, pues forma parte de compuestos tan fundamentales como proteínas, enzimas, ácidos nucleídos y clorofila, necesitándose principalmente en los tejidos vegetales en crecimiento e interviene en la multiplicación celular y se considera factor de crecimiento y desarrollo (Urzúa, 2005; Córdova *et al.*, 2013; García *et al.*, 2010; Mayz, 2004; Carvajal & Mera, 2010; Wu *et al.*, 2005). Otro factor que explica este efecto, es la relación positiva de la densidad de bacterias fijadoras de nitrógeno presentes en el biofertilizante con los parámetros de crecimiento de las plántulas de los tratamientos T1-BIO1, T2-BIO2, T3-BIO3 y T4-BIO4. Al respecto, Bashan *et al.* (1996) y Ferrera y Alarcón (2001), mencionan que la existencia de *Azospirillum* en la rizósfera promueve el crecimiento vegetal a través de la fijación de nitrógeno atmosférico y la síntesis de hormonas reguladoras de crecimiento.

Estudios realizados en banano presentaron la misma respuesta, al incrementar el tamaño del tallo en respuesta positiva del aumento de la dosis de biofertilizantes a base de estiércol de pollo y bacterias *Azotobacter* sp, *Azospirillum* sp y bacterias solubilizadoras de fósforo (Rivera *et al.*, 2008). Por otro lado, Rivera *et al.* (2010) reportan una respuesta positiva sobre el diámetro basal del tallo de naranjo agrio sometido a estiércol de pollo, cáscara de naranjo y cachaza inoculados con consorcios constituidos por cepas de *Azospirillum* sp, *Azotobacter* sp y solubilizadoras de fósforo, con un 52.4% mayor respecto al tratamiento testigo. Mientras que López *et al.* (2008), señalan que al agregar inóculo de bacterias fijadoras de nitrógeno y bacterias solubilizadoras de fósforo sobre un cultivar de maíz, las plantas mostraron un mayor diámetro de tallo, comparado con plantas tratadas con fertilizantes químicos (urea, P_2O_5 y K_2O).

Estudios realizados por Mason *et al.* (2000), en plántulas de *Eucalyptus globulus* Labill preinoculadas con hongos micorrízicos y con nutrientes óptimos para fomentar el desarrollo de micorrizas, reportan diferencias significativas por el efecto de los hongos sobre el diámetro del tallo y materia seca, alcanzando diámetros de 3.36-4.18 mm a doce semanas de establecidas en macetas y 5.15-6.14 mm a veinticuatro semanas. Por otro lado Monsalve *et al.* (2009), evaluaron el efecto de la aplicación de cuatro concentraciones de nitrógeno sobre atributos morfológicos de plántulas de *Eucalyptus globulus*, a diez semanas de establecidas en vivero las plántulas que alcanzaron mayor diámetro de tallo fueron las fertilizadas con 200 mg L⁻¹, con 3.3 mm. En este sentido, el efecto de las formulaciones a partir de estiércol de pollo y hojarasca, inoculadas con consorcio de cepas de *Azospirillum* sp y *Azotobacter* sp sobre plántulas de *Eucalyptus*, exponen mejores resultados a los mencionados anteriormente, ya que a 105 días de la siembra de plántulas en macetas, se alcanzaron diámetros de tallo en el rango de 6.05-8.3 mm, además de cumplir con el tamaño adecuado de cuello radicular para el trasplante definitivo (FAO, 1981).

3.6.2.3 Número de hojas

Los cambios en las medias del número de hojas de plántulas de eucalipto durante 105 días se observan en la Figura 3.20. Los tratamientos mostraron diferencias estadísticas significativas ($p \leq 0.05$) (Anexo A24).

El incremento del número de hojas mostró un comportamiento lineal con respecto al tiempo, en la Figura 3.20 se observan las ecuaciones de regresión lineal para el número de hojas de plántulas de *E. grandis* establecidas en vivero, la pendiente define el aumento del número de hojas de las plántulas con respecto al tiempo, la pendiente más grande correspondió al T4-BIO4, lo que significa que este tratamiento tuvo las plántulas con mayor número de hojas (311 hojas), mientras que la menor pendiente corresponde al tratamiento T6-T, con menor número de hojas (108 hojas) al término del periodo de evaluación. Cabe destacar que el número de hojas de las plántulas del tratamiento T4-BIO4 representó el 177.71% del número de hojas que fueron capaces de desarrollar las plántulas fertilizadas químicamente con urea del tratamiento T5-FQ y 287.96% del número de hojas correspondiente a las plántulas del tratamiento testigo sin fertilización T6-T (Figura 3.21).

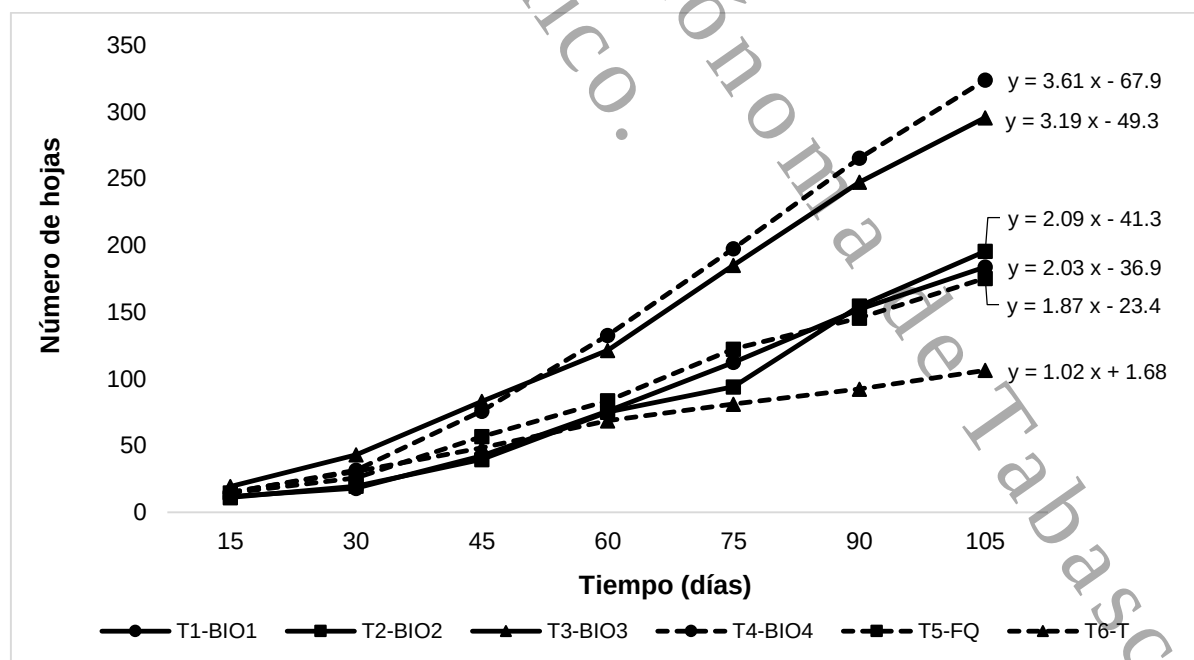


Figura 3.20. Dinámica de crecimiento de hojas en plántulas de *E. grandis* sembradas en macetas. T1-BIO1: Biofertilizante dosis 1; T2-BIO2: Biofertilizante dosis 2; T3-BIO3: Biofertilizante dosis 3; T4-BIO4: Biofertilizante dosis 4; T5-FQ: Urea; T6-T: Testigo. x=Tiempo (días), y= número de hojas.



Figura 3.21. Ramas de plántulas de *E. grandis* después de 105 días de establecidas en invernadero con biofertilizante nitrogenado a partir de *Azotobacter* sp y *Azospirillum* sp (T1-BIO1, T2-BIO2, T3-BIO3, T4-BIO4), fertilizante químico urea (T5-FQ) y sin fertilización (T6-T).

El crecimiento foliar no fue sobresaliente en las plántulas del tratamiento T6-T, este comportamiento se debe posiblemente a las características de baja fertilidad del suelo de este tratamiento (Monsalve *et al.*, 2009). En la Figura 3.20 se observa que las plántulas de eucalipto tratadas con biofertilizantes de los tratamientos T3-BIO3 y T4-BIO4 desarrollaron mayor número de hojas mensualmente hasta el final del periodo de evaluación. Destacó que el número de hojas de las plántulas fertilizadas químicamente tuvieron un comportamiento semejante a las plántulas del tratamiento T1-BIO1 y T2-BIO2, sin embargo el número de hojas de las plántulas de estos últimos, fueron 5.14% y 12.00% mayor respecto al T5-FQ.

El comportamiento de esta variable por efecto de la aplicación de biofertilizantes fue notoriamente satisfactoria para las plántulas sometidas al tratamiento, ya que se obtuvieron hojas con mayor área foliar comparadas con las de los tratamientos T5-FQ y T6-T (Figura 3.21). El área foliar es una variable muy importante, pues las hojas son órganos fotosintéticos por excelencia y desempeñan las funciones de respiración y transpiración, por lo que al existir mayor área foliar hay grandes superficies fotosintéticas expuestas a la luz, poca pérdida de agua y buen intercambio de los gases que participan en la fotosíntesis (Campbell & Reece, 2007; Curtis & Schnek, 2008). Es bien conocido que la magnitud del área foliar define la capacidad de la cubierta vegetal para interceptar la radiación fotosintéticamente activa, constituye la fuente primaria de energía utilizada por las plantas para la fabricación de tejidos, y es una variable de importancia principal

para el estudio de los mecanismos de intercambio de agua y energía que ayuda a comprender las interacciones cultivo-ambiente (Warnock *et al.*, 2006).

En la Figura 3.22 se observa que las plántulas de eucalipto tratadas con biofertilizantes desarrollaron una coloración verde intensa mientras que las plántulas fertilizadas químicamente y no fertilizadas mostraron una coloración verde pálido con bordes rojizos. La coloración verde de las plantas se debe a la clorofila, que es un pigmento que hace que las hojas se vean verdes, ya que absorbe luz en las longitudes de onda violeta, azul y rojo (dado que refleja la luz verde, la vemos verde). En las plantas, la clorofila tiene la función de colectar la energía luminosa necesaria para iniciar la fotosíntesis, es el pigmento involucrado directamente en la transformación de la energía lumínica en energía química, y es esencial para que la planta produzca los alimentos necesarios para su crecimiento y desarrollo (Campbell & Reece, 2007; Curtis & Schnek, 2008).

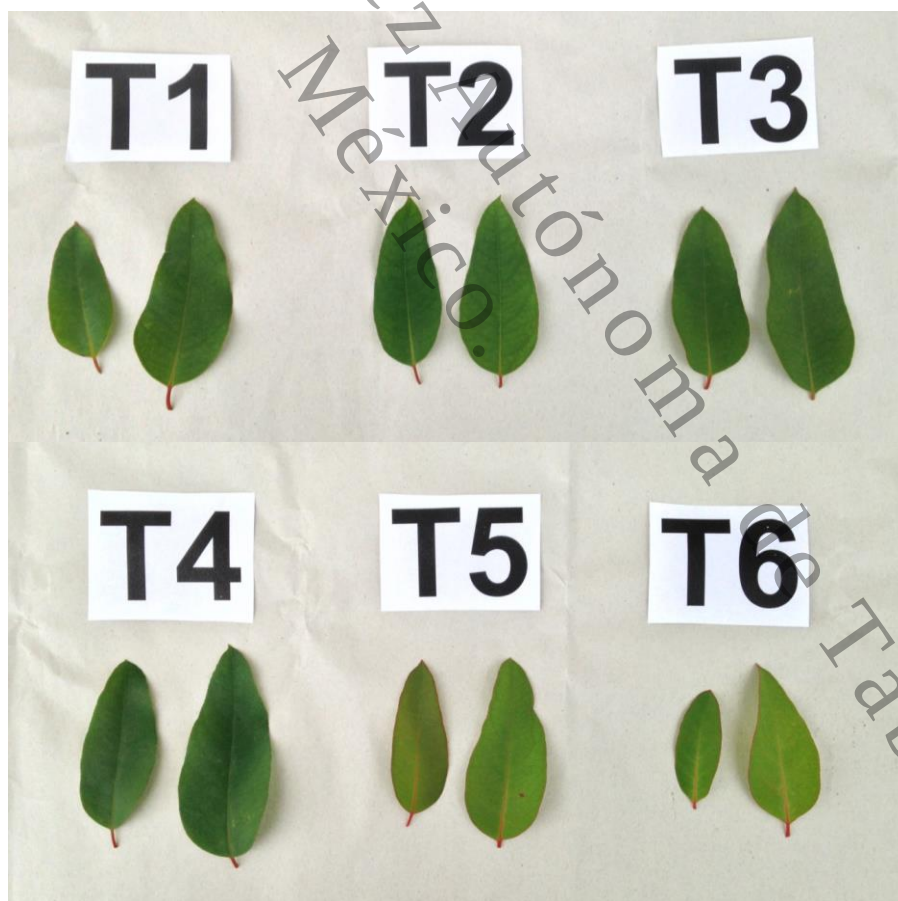


Figura 3.22. Hojas de plántulas de *E. grandis* después de 105 días de establecidas en invernadero con biofertilizante nitrogenado a partir de *Azotobacter* sp y *Azospirillum* sp (T1-BIO1, T2-BIO2, T3-BIO3, T4-BIO4), fertilizante químico urea (T5-FQ) y sin fertilización (T6-T).

La disminución de la producción de clorofila se observó en la reducción del color verde de las hojas de las plántulas del tratamiento T5-FQ y T6-T, lo que expuso indicios de clorosis, que es el amarillamiento del tejido foliar causado por la falta de clorofila. Las causas posibles de la clorosis son: drenaje insuficiente, raíces dañadas, raíces compactadas, alta alcalinidad y deficiencias nutricionales de la planta. Las deficiencias nutricionales pueden ocurrir debido a que el suelo no es rico en nutrientes o porque éstos no están disponibles por el pH alto. También es posible que los nutrientes no puedan absorberse porque las raíces de las plantas están dañadas o poco desarrolladas (Arauz, 1998).

Es de resaltar que la coloración de las hojas de eucaliptos refleja los síntomas que presentan las plántulas cuando carecen de ciertos minerales. Al respecto, la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO), menciona que los síntomas localizados sobre las hojas más viejas de eucaliptos, cuando carecen de nitrógeno, presentan un ligero amarilleo, apareciendo primero sobre las hojas más viejas, luego sobre las más jóvenes. A medida que la carencia se agudiza, las láminas foliares muestran un color amarillo limón, apareciendo después pequeñas manchas rojizas, que se extienden y cubren toda la hoja (FAO, 1981).

3.6.2.4 Biomasa radical y aérea

El cálculo de la biomasa, definida como la cantidad de materia vegetal presente en una determinada superficie y en un momento concreto, resulta una buena aproximación para determinar y evaluar el nivel de desarrollo en plantas. Los cambios en las medias de las variables peso fresco y seco de la biomasa aérea (BA) y radical (BR) de plántulas de eucalipto durante 105 días se observan en las Figuras 3.23 y 3.24. Los tratamientos mostraron diferencias estadísticas significativas (Tukey $p \leq 0.05$) (Anexo A25 y A26). En la Figura 3.25 se observa el efecto de los tratamientos sobre el peso de la biomasa seca (BSA y BSR) de plántulas de *E. Grandis*. Cabe señalar que los tratamientos T4-BIO4, T5-FQ y T6-T, están fuera del límite de confianza de 35.79 ± 9.05 para BSA y 5.842 ± 2.705 para BSR, lo que significa que el efecto de estos tratamientos fue altamente significativo.

Las plántulas con mayor peso de biomasa fresca aérea (BFA) y radical (BFR) fueron las del tratamiento T4-BIO4 (92.0 y 15.8 g.planta⁻¹ de BFA y BFR, respectivamente), mientras que las plántulas con menor peso fresco de biomasa aérea y radical fueron las del tratamiento T6-T (19.5 y 3.8 g.planta⁻¹ de BFA y BFR, respectivamente). Cabe destacar que la BFA de las plántulas del tratamiento T4-BIO4 fue 249.8% mayor respecto a las plántulas fertilizadas químicamente y 371.7% mayor a las plántulas del tratamiento control (Figura 3.23). Al igual que otras variables dasométricas estimadas (altura, diámetro de tallo y número de hojas), este parámetro aumentó cuando se incrementó la dosis de los biofertilizantes a base de BFN de los géneros *Azotobacter* sp y *Azospirillum* sp y sustratos orgánicos.

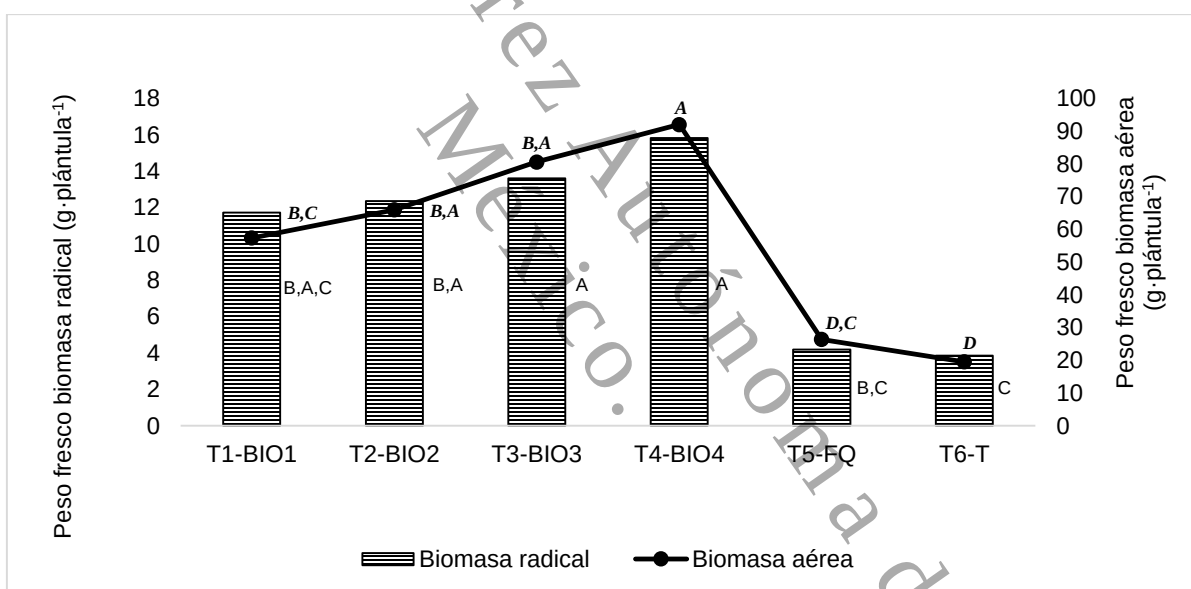


Figura 3.23. Peso fresco de la biomasa aérea y radical de *E. grandis* a 105 días de sembradas en macetas. T1-BIO1: Biofertilizante Dosis 1; T2-BIO2: Biofertilizante dosis 2; T3-BIO3: Biofertilizante dosis 3; T4-BIO4: Biofertilizante dosis 4; T5-FQ: Urea; T6-T: Testigo. Letras diferentes sobre de cada variable indican diferencias estadísticas entre medias de tratamientos (Tukey $p \leq 0.05$, $A > B > C$).

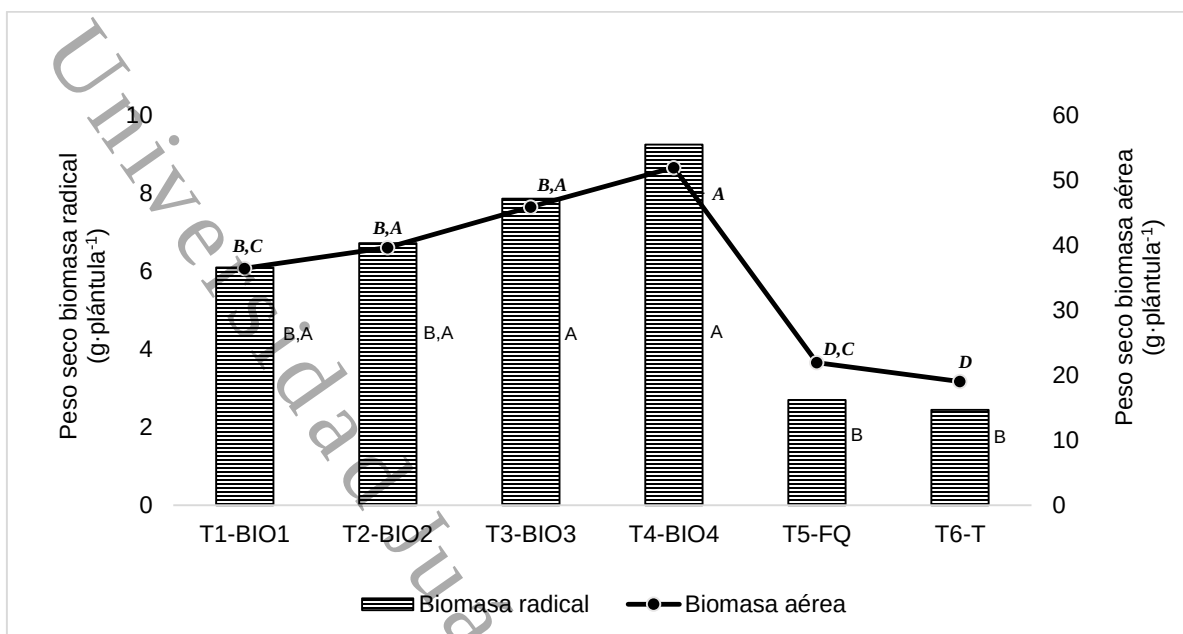


Figura 3.24. Peso seco de la biomasa aérea y radical de *E. grandis* a 105 días de sembradas en macetas. T1-BIO1: Biofertilizante Dosis 1; T2-BIO2: Biofertilizante dosis 2; T3-BIO3: Biofertilizante dosis 3; T4-BIO4: Biofertilizante dosis 4; T5-FQ: Urea; T6-T: Testigo. Letras diferentes sobre de cada variable indican diferencias estadísticas entre medias de tratamientos (Tukey $p \leq 0.05$, $A > B > C$).

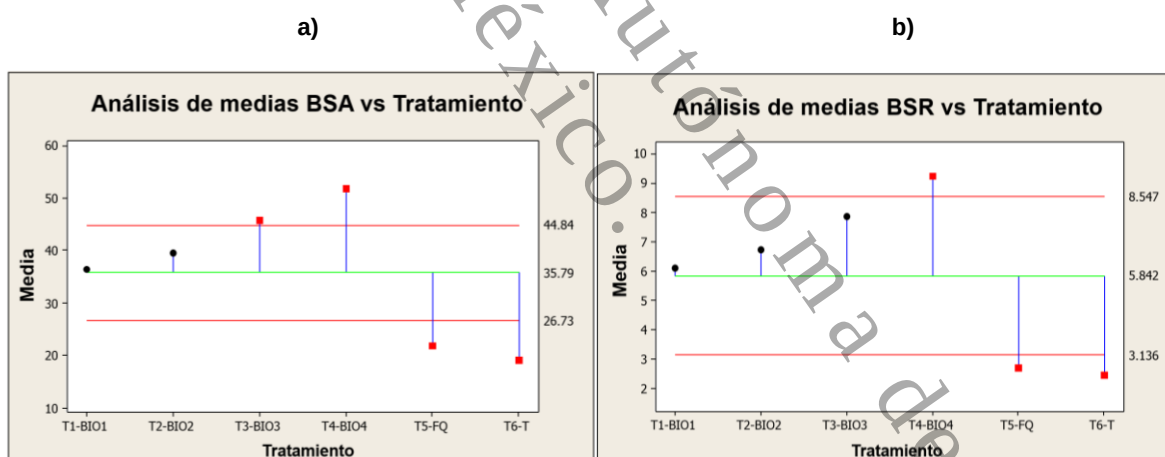


Figura 3.25. Análisis de medias de la biomasa seca (g·plántula⁻¹) de plántulas de *E. grandis* de tratamientos, a) Biomasa aérea, b) Biomasa radical. ($p \leq 0.05$).

Con respecto al peso seco de la biomasa aérea y radical, el mayor valor correspondió a las plántulas del T4-BIO4 (51.90 y 9.23 g·planta⁻¹, respectivamente), mientras que las plántulas con menor peso seco de la biomasa total fueron las del T6-T (19.04 y 2.44 g·planta⁻¹, respectivamente). Los resultados mostraron que el peso seco de la biomasa total de las plántulas del tratamiento

T4-BIO4 fue 148.2% mayor que las plántulas fertilizadas químicamente y 184.5% mayor que las plántulas sin fertilizar (Figura 3.24 y 3.26). Es de resaltar que se esperaba este comportamiento, ya que existe una relación entre el peso fresco y peso seco, pues este último es un parámetro dependiente del peso fresco, esta dependencia se expresa a través de la relación entre el contenido de humedad de la planta y su etapa de crecimiento (Bänziger *et al.*, 1997). Resultados similares fueron reportados por Mohammad y Prasad (1998), con aumentos del 44% en la biomasa de plántulas de *Eucalyptus camaldulensis*, una vez que fueron inoculadas con *Azotobacter Chroococcum* y *Bacillus megaterium*.

Para estudiar el desarrollo de plantas en vivero se calculó la relación biomasa seca aérea/ biomasa seca radical (BSA/BSR) de acuerdo al procedimiento de Orozco *et al.*, 2010. La proporción BSA/BSR para T1-BIO1, T2-BIO2, T3-BIO3, T4-BIO4, T5-FQ y T6-T, fue de 5.973, 5.898, 5.837, 5.618, 8.113 y 7.788, respectivamente. En los seis tratamientos, los valores obtenidos en la relación fueron mayores a uno, por lo que existe una buena relación entre la parte aérea y la parte radicular (Orozco *et al.*, 2010).

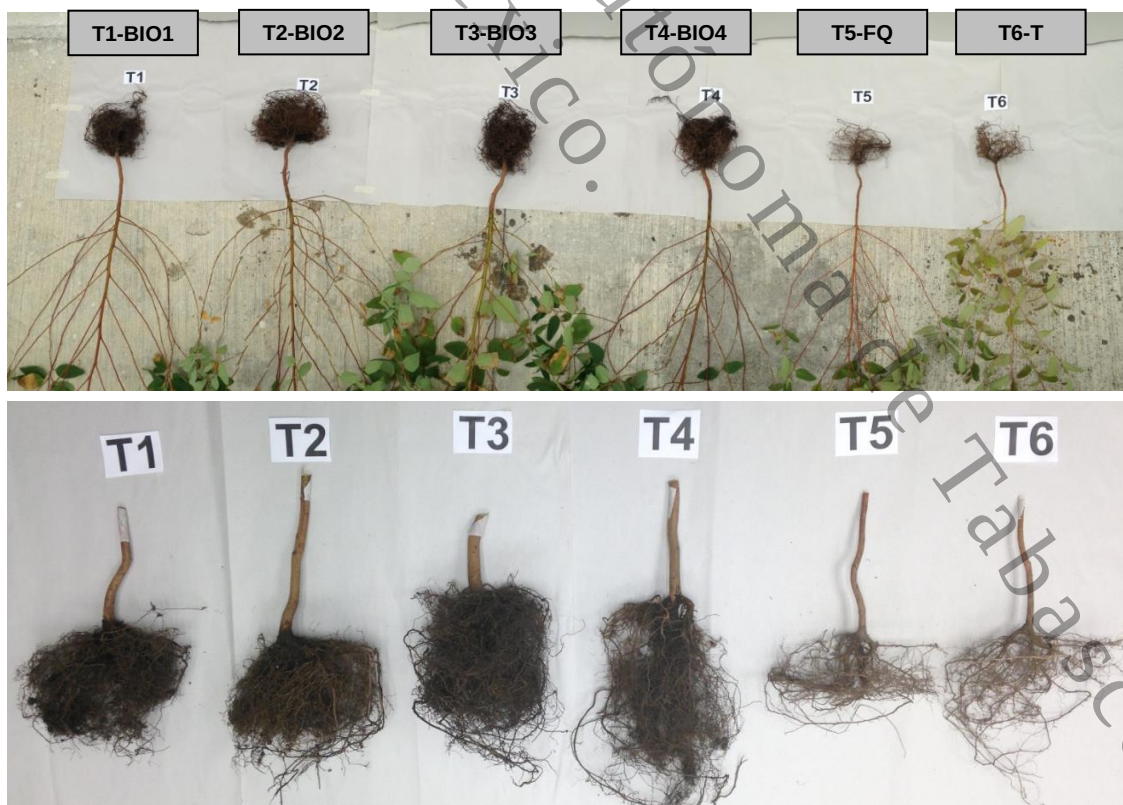




Figura 3.26. Desarrollo radical de plántulas de *E. grandis* después de 105 días de establecidas en invernadero con biofertilizante nitrogenado a partir de *Azotobacter* sp y *Azospirillum* sp (T1-BIO1, T2-BIO2, T3-BIO3, T4-BIO4), fertilizante químico urea (T5-FQ) y sin fertilización (T6-T).

Los valores en la relación BSA/BSR de las plántulas del T1-BIO1, T2-BIO2, T3-BIO3, T4-BIO4 fueron menores respecto a las fertilizadas químicamente y a las del tratamiento control, al respecto, Piña & Arboleda (2010), mencionan que una menor relación BSA/BSR sugiere mayor capacidad para la absorción de agua y nutrientes, lo que garantiza la posibilidad de soportar las mayores tasas fotosintéticas y de transpiración.

La raíz es el órgano que le permite a la planta fijarse al suelo, absorber minerales, agua y almacenar nutrientes orgánicos. Para el estudio del sistema radical de las plántulas de *E. grandis*, se tomaron raíces de aproximadamente 400 μm de diámetro y se observaron en un microscopio óptico, las micrografías (Figura 3.27) revelaron un gran desarrollo de raíces laterales en las plántulas de los tratamientos T1-BIO1, T2-BIO2, T3-BIO3 y T4-BIO4, y a su vez cada raíz lateral originó sus propias raíces secundarias, produciendo así un sistema radical muy desarrollado. Mientras que el sistema radical de las plántulas de los tratamientos

T5-FQ y T6-T no fue tan ramificado (Figura 3.27). Resultados similares fueron obtenidos por Díaz *et al.* (2009), al estudiar el efecto de rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal sobre el enraizamiento de *Eucalyptus globulus*, alcanzando aumento significativo del enraizamiento de plantas inoculadas en el rango de 191.4 a 69.4% con respecto al control, asociando este efecto a la producción bacteriana de AIA (ácido indolacético) y a la alta sensibilidad de las raíces a esta hormona, causada por respuesta de la inoculación de las PGPR. Al respecto Glick *et al.*, (1999), mencionan que las bacterias que producen grandes cantidades de auxinas promuevan la formación de raíces laterales y el desarrollo de pelo absorbente. Es conocido que las bacterias fijadoras de forma asociativa se consideran rizobacterias promotoras del crecimiento porque sintetizan altas cantidades de sustancias activas reguladoras del crecimiento. Según Glick (1995), este efecto actúa directamente sobre el desarrollo de las plantas y el conjunto de sustancias que son asimiladas a través de las raíces permite que cada una de ellas actúe en el momento en que la planta lo requiera.

Por otro lado, el efecto del crecimiento de las raíces puede deberse a los mecanismos directos de las bacterias, tales como la síntesis de reguladores de crecimiento, liberación de micronutrientes, fijación de nitrógeno y estimulación de los mecanismos de resistencia a enfermedades. Adicionalmente, los mecanismos indirectos también pueden estimular el crecimiento mediante la supresión de patógenos a través de antibiosis, parasitismo, y disminución de la competencia espacial y de nutrientes (Patten y Glick 2002; Ping & Boland 2004; Rao & Krishna 2006).

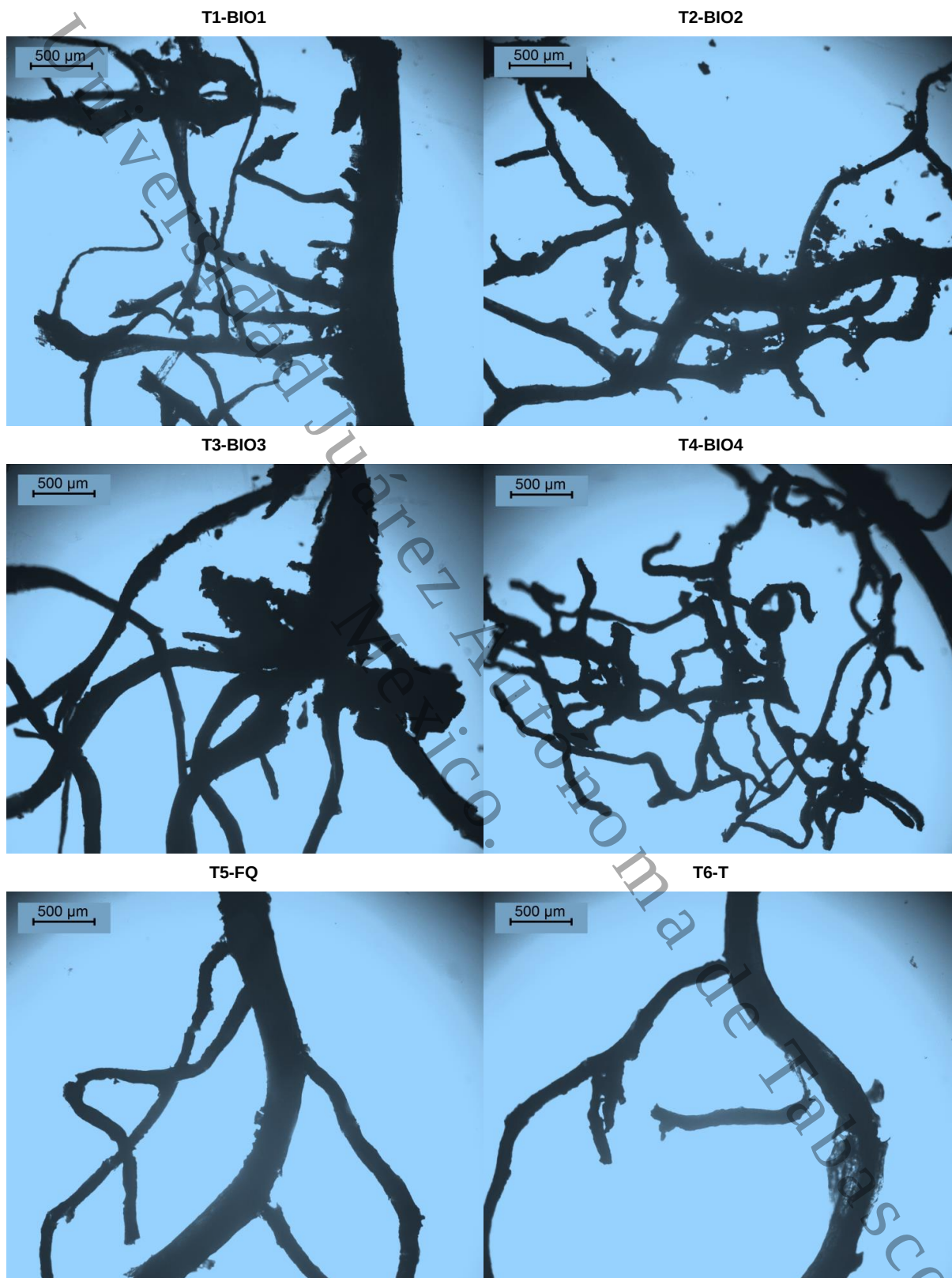


Figura 3.27. Micrografías ópticas. Desarrollo de raíces secundarias en plántulas de *E. grandis* después de 105 días de establecidas en invernadero con biofertilizante nitrogenado a partir de *Azotobacter* sp y *Azospirillum* sp (T1-BIO1, T2-BIO2, T3-BIO3, T4-BIO4), fertilizante químico urea (T5-FQ) y sin fertilización (T6-T).

El sistema radical altamente ramificado y expandido de las plántulas dosificadas con biofertilizantes, les permitirá posibilitar funciones importantes al momento de su trasplante definitivo, como la fijación exitosa al suelo, absorción y transporte de agua, sales y nutrientes, además de transportar y almacenar productos de la fotosíntesis generados en la parte aérea de la planta, que ayudarán a la planta a recuperarse de la reacción como consecuencia del trasplante (Alonso, 2011; FAO, 1981). Cabe señalar que el sistema de raíces completo ayuda a la planta a fijarse al suelo pero, en la mayoría de las plantas, la absorción de agua y minerales se produce sobre todo, cerca de los extremos de la raíz, donde existe gran número de diminutos pelos radiculares que aumentan enormemente la superficie de absorción (Campbell & Reece, 2007).

3.6.3. Propiedades químicas del suelo con plántulas de *E. grandis* en condiciones de invernadero

Los cambios en el contenido de nitrógeno total (N_T) y fósforo disponible (P_D) durante el periodo de evaluación se observan en la Figura 3.28 y 3.29. En ambos parámetros químicos, los tratamientos mostraron diferencias estadísticas significativas (Tukey $p \leq 0.05$) (Anexo A27 y A28). En los primeros 15 días, el tratamiento T5-FQ tuvo los mayores contenidos de N_T , este efecto puede deberse a la alta concentración de nitrógeno de la urea ($CO(NH_2)_2$) (46% N). Mientras que para los días 60 y 105 el contenido de N_T se redujo considerablemente en un 35.2%, posiblemente por el riego aplicado que provocó la lixiviación de N, ya que la urea tiene alta solubilidad (alrededor de $1000 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ a 20°C) (IFA, 2015). Aun así, al término del ciclo el suelo del tratamiento T5-FQ tuvo más N_T que las plántulas no fertilizadas, de acuerdo a la clasificación de la NOM-021-SEMARNAT-2000, el contenido de N_T se considera medio en el T5-FQ, mientras que en el T6-T es bajo (Figura 3.28) (SEMARNAT, 2002). Cabe resaltar que estas pérdidas afectaron los parámetros de crecimientos de las plántulas, como la altura, diámetro de tallo, desarrollo radical y biomasa total.

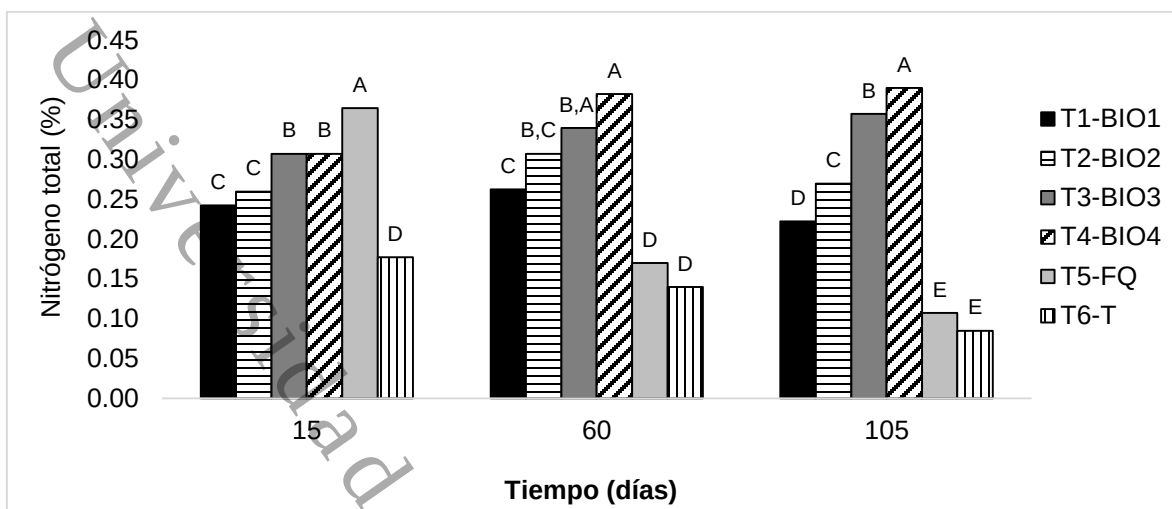


Figura 3.28. Contenido de nitrógeno total en suelo con plántulas de *E. grandis* a 15, 60 y 105 días de sembradas en macetas. T1-BIO1: Biofertilizante Dosis 1; T2-BIO2: Biofertilizante dosis 2; T3-BIO3: Biofertilizante dosis 3; T4-BIO4: Biofertilizante dosis 4; T5-FQ: Urea; T6-T: Testigo. Valores con letras diferentes sobre de cada columna indican diferencias estadísticas entre medias de tratamientos (Tukey $p \leq 0.05$, $A > B > C$).

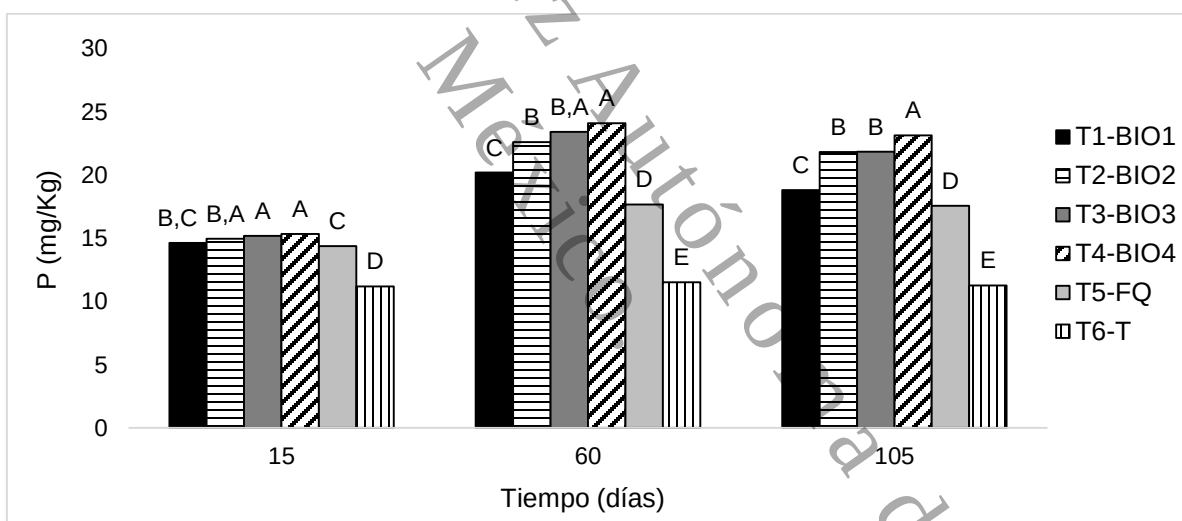


Figura 3.29. Contenido de fósforo en suelo con plántulas de *E. grandis* a 15, 60 y 105 días de sembradas en macetas. T1-BIO1: Biofertilizante Dosis 1; T2-BIO2: Biofertilizante dosis 2; T3-BIO3: Biofertilizante dosis 3; T4-BIO4: Biofertilizante dosis 4; T5-FQ: Urea; T6-T: Testigo. Valores con letras diferentes sobre de cada columna indican diferencias estadísticas entre medias de tratamientos (Tukey $p \leq 0.05$, $A > B > C$).

Existió una respuesta positiva en el contenido de N_T por el uso de los biofertilizantes, el suelo de macetas en los tratamientos T1-BIO1, T2-BIO2, T3-BIO3 y T4-BIO4 mostraron un incremento de N_T directamente proporcional a la dosis aplicada. En estos tratamientos, el incremento fue mayor del día 15 al día 60 con aumentos de 8.26%, 15.38%, 13.33%, 26.66%, respectivamente. Mientras

que del día 60 al día 105 el contenido de N_T en los tratamientos T1-BIO1 y T2-BIO2 se redujo en un 16.03% y 10%, y en los tratamientos T3-BIO3 y T4-BIO4 aumentó en 5.8% y 2.6%. A pesar de estos resultados, el contenido de N_T fue alto de acuerdo a la clasificación de la NOM-021-SEMARNAT-2000. Estos resultados manifiestan que la fijación biológica de nitrógeno durante el periodo de evaluación pudo haber dejado más N_T disponible, además el estímulo de la mineralización, causado por los sustratos orgánicos pollinaza y hojarasca, tuvo mayor incidencia en el desarrollo de las plántulas. Cabe resaltar que se han reportado inoculaciones efectivas en variables nutricionales de especies arbóreas. Kowaljew *et al.* (2010) reportaron aumentos de 1.6 veces de N_T al incorporar fertilizantes orgánicos en suelo con uso forestal. Mientras que Orozco y Martínez (2009) obtuvieron mayor contenido de N en suelo al inocular con BFN del género *Azotobacter* aisladas de la rizósfera de *Pinus patula* con aumentos de 5.5 veces de contenido de nitrógeno en suelo respecto al suelo no inoculado. Al respecto López *et al.* (2010), en un estudio de la capacidad de fijación de nitrógeno atmosférico, reporta que las BFN pueden aportar al suelo entre 46 y 50 kg de $N \cdot ha^{-1}$.

En cuanto al fósforo disponible, P_D , también existió una respuesta positiva por el uso de biofertilizantes, el suelo de macetas en los tratamientos T1-BIO1, T2-BIO2, T3-BIO3 y T4-BIO4 mostraron un incremento de P_D directamente proporcional a la dosis aplicada (Figura 3.29). En estos tratamientos, el incremento fue mayor del día 15 al día 60 con aumentos de 37.90%, 51.17%, 54.28% y 57.24%, respectivamente. Mientras que del día 60 al día 105 el contenido de P_D se redujo en un 6.83%, 3.49%, 6.78% y 3.94%, respectivamente. A pesar de estos resultados, el contenido de P_D resultó un valor medio de acuerdo a la clasificación que hace la NOM-0021-SEMARNAT-2000. Al respecto, Armenta *et al.* (2010) mencionan que la mayor disponibilidad de fósforo en suelos tratados con biofertilizantes inoculados con bacterias se debe a que la disponibilidad del fósforo para la planta está influenciada por los microorganismos de la rizósfera ya que un alto porcentaje de las bacterias de la rizósfera y el rizoplasma son capaces de degradar sustrato de fósforo orgánico. Por otro lado, el P_D de los tratamientos T5-

FQ y T6-T, se considera medio y bajo, respectivamente, de acuerdo a la clasificación de la NOM-021-SEMARNAT-2000. Este efecto puede estar relacionado con el mecanismo de solubilización de fósforo, que es un proceso relacionado fundamentalmente con la producción y liberación de ácidos orgánicos por algunos microorganismos del suelo, estos ácidos son resultantes de la respiración oxidativa o de procesos fermentativos microbianos y su producción está fuertemente regulada por la fuente de carbono y nitrógeno disponibles para la nutrición del microorganismo (Patiño & Sanclemente, 2014). Los ácidos orgánicos reportados como mediadores del proceso de solubilización son: ácido oxálico, cítrico, butírico, malónico, láctico, succínico, málico, glucónico, acético, glicólico, fumárico, adípico, indolacético y 2-cetoglucónico (Illmer & Shinner, 1995; Paredes & Espinoza, 2010). En este sentido, es importante resaltar que la capacidad solubilizadora de fósforo por *Azotobacter* y *Azospirillum* ha sido reportada en diversas investigaciones (Narula *et al.*, 2002; Narula *et al.*, 2004; Rodríguez *et al.*, 2004; G. Faccini *et al.*, 2007; Tahir *et al.*, 2013; Nosrati *et al.*, 2014).

El suelo de las unidades experimentales que recibieron biofertilización tuvieron mayores contenidos de materia orgánica durante todo el periodo de evaluación, con diferencias estadísticas significativas (Tukey $p \leq 0.05$) (Anexo A29). El suelo con mayor contenido de materia orgánica (MO) fue el del tratamiento T4-BIO4, que al término de la fase de evaluación incrementó 3.5 y 3.75 veces respecto al suelo de los tratamientos T5-FQ y T6-T, respectivamente (Tabla 3.10). Cabe resaltar que el contenido de MO en el suelo de los tratamientos T1-BIO1, T2-BIO2, T3-BIO3 y T4-BIO4 es considerado muy alto de acuerdo a la clasificación de la NOM-021-SEMARNAT-2000, mientras que en los tratamientos T5-FQ y T6-T el contenido fue alto, durante todo el periodo de estudio (SEMARNAT, 2002). Es evidente que los sustratos orgánicos utilizados aumentaron los niveles de carbono en el suelo, lo cual incrementa la fertilidad, de modo que los microorganismos del suelo pueden utilizarlo como fuente energética (García *et al.*, 2014). Rivera *et al.* (2010), mencionan que se han reportado valores altos de carbono mineralizable en suelos tratados con compostas de residuos de destilería y excretas, asociados con materia orgánica fácilmente degradable por la microflora del suelo.

Tabla 3.10. Propiedades químicas del suelo con plántulas de *E. grandis* a 15, 60 y 105 días de sembradas en macetas.

TRATAMIENTO	15 Días		60 Días		105 Días	
	pH	MO	pH	MO	pH	MO
	u. pH	%	u. pH	%	u. pH	%
T1-BIO1	6.5 B ^s	14.52 D ^s	6.5 B ^s	11.56 C ^s	6.3 B ^s	10.22 D ^s
T2-BIO2	6.5 B	15.06 C	6.4 B	13.45 B	6.3 B	11.83 C
T3-BIO3	6.6 B	21.21 B	6.2 C	19.65 A	6.2 C	15.52 B
T4-BIO4	6.6 B	29.48 A	6.3 C	21.21 A	6.2 C,B	19.14 A
T5-FQ	7.5 A	4.95 E	6.9 A	4.82 D	6.9 A	5.40 E
T6-T	5.7 C	5.11 E	5.7 D	4.90 D	5.6 D	5.10 E

T1-BIO1: Biofertilizante Dosis 1; T2-BIO2: Biofertilizante dosis 2; T3-BIO3: Biofertilizante dosis 3; T4-BIO4: Biofertilizante dosis 4; T5-FQ: Urea; T6-T: Testigo. ^sValores con letras diferentes dentro de cada columna indican diferencias estadísticas entre medias de tratamientos (Tukey $p \leq 0.05$, A>B>C).

Al respecto Armenta *et al.* (2010) y García *et al.* (2014), mencionan que la adición de abonos orgánicos influye positivamente en las propiedades físicas del suelo, obteniendo importantes beneficios, entre los que destacan el aumento en los nutrientes, mejoramiento de la capacidad de retención hídrica del suelo (disminución de la escorrentía que evita el lavado de nutrientes), mejores condiciones físicas para el desarrollo de las raíces y el laboreo del suelo, control de algunas enfermedades del suelo que causan la pudrición de raíces y un aumento en la actividad microbiana, que se ve positivamente influenciada por el mayor contenido de fuentes de energía y nutrientes en el suelo, aumentando su desarrollo y actividad, lo que tendrá efectos positivos en el crecimiento vegetal, de esta manera se cierra el ciclo de fertilidad del suelo.

Según Alfonso *et al.* (2005), la efectividad en el uso de microorganismos se logra cuando se dan las condiciones óptimas para metabolizar los sustratos, como disponibilidad de agua, oxígeno, pH y temperatura, así como la disponibilidad de fuentes energéticas, al respecto Reyes y Valery (2007) mencionan que el flujo de la biomasa microbiana del suelo está determinado por el pH y el carbono orgánico presente en el suelo. El pH del suelo de las unidades experimentales mostró diferencias estadísticas significativas durante el periodo de evaluación (Tukey $p \leq 0.05$) (Anexo A30). De acuerdo a la clasificación que hace la NOM-021-SEMARNAT-2000, los valores de pH de los tratamientos T1-BIO1, T2-BIO2, T3-BIO3 y T4-BIO4 se clasifican como moderadamente ácidos (Tabla 3.10), considerado óptimo para el desarrollo de plántulas de eucalipto (5.5-7.5) y para los microorganismos inoculados (4.8-8.5) (Gelfius, 1994; Garrity *et al.*, 2006). Al

respecto, Porta *et al.* (1999) mencionan que a valores inferiores de 5.5 existe poca disponibilidad de nutrimentos en suelo debido a la baja descomposición de la materia orgánica y por la escasa densidad de bacterias y hongos. Por otro lado, el pH del suelo de los tratamientos T5-FQ y T6-T fue neutro y moderadamente ácido, respectivamente. Esta característica en el T6-T se debe a la acidez característica del suelo muestreado en el cultivo de eucalipto. El aumento de pH en el suelo del T5-FQ se debe principalmente a que durante la fase de hidrólisis de la urea, inicialmente se produce un incremento del pH del suelo y luego la posterior oxidación del amonio libera protones, aumentando la acidificación del suelo (Mikkelsen, 2010; Sierra, 2010).

México.

CAPÍTULO IV. CONCLUSIONES

- La rizósfera del cultivo de *E. grandis* alberga bacterias promotoras del crecimiento vegetal del género *Azotobacter sp* y *Azospirillum sp*. Que producen de auxinas del tipo AIA con valores en el rango de $31.40 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ a $42.80 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$.
- El tiempo óptimo para la producción de biofertilizantes se alcanzó a los 30 días de establecido el bioensayo, en este tiempo se manifestó mayor densidad de *Azospirillum sp* en BIO-AZT3 con $1.93 \times 10^7 \text{ UFC}\cdot\text{mL}^{-1}$ y de *Azotobacter sp* en BIO-AZP2 con $9.23 \times 10^6 \text{ UFC}\cdot\text{mL}^{-1}$ y altos contenidos de nitrógeno total (2.15-5.64%).
- Los biofertilizantes a base de bacterias rizosféricas estimularon el crecimiento y mejoraron los atributos morfológicos de plántulas de *E. grandis*, este resultado se relacionó con las dosis aplicadas de biofertilizantes en macetas y su uso permitió que las plántulas alcanzaran la altura y diámetro de cuello radicular adecuados para el trasplante definitivo, antes del tiempo reportado por diversos autores. El tratamiento que tuvo incrementos significativos en el desarrollo de las plántulas fue el T4-BIO4, con tasas de crecimiento de 0.701 cm de altura, 0.075 mm de diámetro de tallo y 3.61 número de hojas por unidad de tiempo, y estimuló el enraizamiento de las plántulas en vivero, poniendo de manifiesto la efectividad de la inoculación con bacterias BFN. Este efecto benéfico sugiere la viabilidad de estas bacterias para ser utilizadas en programas de producción clonal de *E. grandis*, ya que el uso de biofertilizantes resultó significativamente positivo.
- La aplicación de biofertilizantes demostró alta efectividad en los suelos de los tratamientos en condiciones de vivero, con altos contenidos de N_T (0.22-0.39 %), P_D (18.81-23.14 mg/Kg) y CO (17.6-32.9 %) según la clasificación de la normativa vigente en calidad de suelo, además de mantener un pH adecuado que reforzó la dependencia de la especie vegetal a estas

condiciones fisicoquímicas y favoreció la adaptabilidad de los microorganismos nativos inoculados al suelo de macetas.

- En México la madera de *E. grandis* principalmente es destinada como materia prima para la industria papelera. Los resultados de los modelos que relacionan el comportamiento de las variables dasométricas en función del tiempo, demostraron que con el uso de biofertilizantes es factible lograr ejemplares de *E. grandis*, para producir materia prima para pulpa en turnos menores a seis años, siendo considerablemente menores a los turnos de producción para este mismo fin, utilizando el sistema de fertilización convencional (6-8 años).

CAPÍTULO V. RECOMENDACIONES

Los resultados obtenidos sugieren que los biofertilizantes integrados con sustratos orgánicos e inoculados con BFN, aportan altos valores de nitrógeno y pueden ayudar significativamente a reducir la aplicación de fertilizantes nitrogenados de origen industrial sobre las plantaciones de interés forestal, lo cual incide sobre la reducción en los costos de producción y contribuye a disminuir el impacto negativo sobre el ambiente.

Se recomienda caracterizar las cepas encontradas mediante identificación bioquímica, identificación molecular y huella genética, para garantizar que corresponden a los géneros *Azotobacter* y *Azospirillum*.

Se recomienda probar el biofertilizante en las plantaciones de cultivo de eucalipto en los primeros meses de establecimiento de las plántulas, así como controlar las variables que afecten el crecimiento poblacional de bacterias benéficas en los sustratos ya que éste es rico en materia orgánica y es un subproducto de la producción de eucalipto, con lo cual se puede generar una producción orgánica sostenible. Inicialmente puede usarse como un complemento a la fertilización química convencional, con el fin de sustituirla a mediano o largo plazo considerando las condiciones de fertilidad del suelo y la respuesta del propio cultivo.

Por otro lado, se recomienda que las cepas seleccionadas sean evaluadas a través de otros métodos y procedimientos para determinar su capacidad real de fijación de N, que permitan seleccionar las más efectivas y compatibles con el cultivo y suelo, antes de utilizarse como biofertilizantes. Asimismo, deben considerarse las variables que permitan valorar que el proyecto sea económicamente viable, tecnológicamente aplicable, ambientalmente sustentable y socialmente aceptable.

LITERATURA CITADA

- Adriano-Anaya, M. de L., Jarquín-Gálvez, R., Hernández-Ramos, C., Figueroa, M.S. & Monreal-Vargas, C.T. (2011). Biofertilización de café orgánico en etapa de vivero en Chiapas, México. *Revista mexicana de ciencias agrícolas*, 2(3):417-431.
- Aguirre-Medina, J.F., Irizar-Garza, M.B., Durán-Prado, A., Grageda-Cabrera, O.A., Peña-Del Río, M. de los A., Loredó-Osti, C. & Gutiérrez-Baeza, A. (2009). Los Biofertilizantes microbianos: alternativa para la agricultura en México. Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias. Campo Experimental Rosario Izapa, Tuxtla Chico, Chiapas, México. Folleto Técnico No. 5.
- Aguirre-Medina, J.F., Moroyoqui-Ovilla, D.M., Mendoza-López, A., Cadena-Iñiguez, J., Avendaño-Arrazate, C.H. & Aguirre-Cadena, J.F. (2011). Hongo endomicorrízico y bacteria fijadora de nitrógeno inoculadas a *Coffea arabica* en vivero. *Agronomía Mesoamericana*, 22(1):71-80.
- Alfonso, E.T., Leyva, A. & Hernández, A. (2005). Microorganismos benéficos como biofertilizantes eficientes para el cultivo del tomate (*Lycopersicon esculentum*, Mill). *Revista Colombiana d. Biotecnología*, 7(2):47-54.
- Alonso-Peña, J.R. (2011). Manual de histología vegetal. Editorial Paraninfo, Madrid, España. 113 pp.
- Álvarez-Solís, J.D., Gómez-Velasco, D.A., León-Martínez, N.S. & Gutiérrez-Miceli, F.A. (2010). Manejo integrado de fertilizantes y abonos orgánicos en el cultivo de maíz. *Agrociencia*, 44(5): 575-586.
- Angulo, V.C., Sanfuentes, E.A., Rodríguez, F. & Sossa, K.E. (2014). Caracterización de rizobacterias promotoras de crecimiento en plántulas de *Eucalyptus nitens*. *Rev Argent Microbiol.*, 46(4):338-347.
- Aquiahuatl-Ramos, M. de los A., Sepúlveda-Volke, T., Prado-Barragán, L.A., Shirai-Matsumoto, K., Ramírez-Vives, F. & Salazar-González, M. (2012). Manual de prácticas de laboratorio. Microbiología General. División de ciencias biológicas y de la salud, Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Iztapalapa, México D.F. Ed. Casa abierta al tiempo. 20 pp.
- Arauz-Cavallini, L.F. (1998). Fitopatología: Un Enfoque Agroecológico. Editorial Universidad de Costa Rica. 1ra. Edición, San José, Costa Rica. 44-48 pp.
- Arias-López, F.T. (2010). Efecto de los niveles de Vitafert y melaza en la pollinaza fermentada aeróbica. Colegios de postgraduados. Tesis para optar al grado de maestro en ciencias. 6-8 pp.
- Armenta-Bojórquez, A.D.; García-Gutiérrez, C.; Camacho-Báez, J.R., Apodaca-Sánchez, M.A., Gerardo-Montoya, L. & Nava-Pérez, E. (2010). Biofertilizantes en el desarrollo agrícola de México. *Ra Ximhai*, 6(1): 51-56.

- Baca, B.E., Soto-Urzuá, L. & Pardo-Ruiz, M.P. (2000). Fijación biológica de nitrógeno. *Ciencia y Cultura*, 7(38):43-49.
- Banerjee, M.R., Yesmin, L., & Vessey, J.K. (2006). *Plant-growth-promoting rhizobacteria as biofertilizers and biopesticides*, en Handbook of Microbial Biofertilizers, M.K. Rai, Ed., Food Products Press, Binghamton, NY, USA, 137-181 pp.
- Bashan, Y. & De Bashan, L.E. (2010). How the Plant Growth-Promoting Bacterium *Azospirillum* Promotes Plant Growth. Chapter II. *A Critical Assessment Advances of Agronomy*, 108: 77-136.
- Bashan, Y. & Holguin, G. (1998). Proposal for the division of plant growth-promoting rhizobacteria into two classifications: biocontrol PGPB (plant growth-promoting bacteria) and PGPB. *Soil Biol. Biochem.*, 30:1225-1228.
- Bashan, Y., Holguin G. & de-Bashan, L.E. (2004). *Azospirillum*-plant relationships: physiological, molecular, agricultural and environmental advances (1997-2003). *Canadian Journal of Microbiology*, 50(8):521-557.
- Bashan, Y., Holguín, G. & Ferrera-Cerrato, R. (1996). Interacciones entre plantas y microorganismos benéficos. I. *Azospirillum*. *Terra Latinoamericana*, 14(2):159-194.
- Bänziger, 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.
- Batish, D.R., Pal, S., Kumar, K., Kaur, S. (2008). *Eucalyptus* essential oil as a natural pesticide. *Forest Ecology and Management*, 256(12): 2166-2174.
- Becerra-De Armas, E., Lugo-Ruiz, I., Más-Martínez, R.; Pineda-Ruiz, E.; Viñas-Quintero, Y. (2014). Uso del biofertilizante *Azospirillum* como fuente alternativa para la fertilización nitrogenada de la caña de azúcar. *ICIDCA. Sobre los Derivados de la Caña de Azúcar*, 48(3):49-53.
- Benito, M., Masaguer, A., Moliner, A.; Arrigo, N. & Palma, R.M. (2003). Chemical and microbiological parameters for the characterisation of the stability and maturity of pruning waste compost. *Biol Fertil Soils*, 37:184-189.
- Bernal, M.P., Paredes, C., Sánchez-Monedero, M.A. & Cegarra, J. (1998). Maturity and stability parameters of composts prepared with a wide range of organic wastes. *Bioresource Technology*, 63:91-99.
- Betancourt-Yanez, P., González-Rios, J., Figueroa-Sandoval, B. & González-Cossio, F. (1999). Materia orgánica y caracterización de suelos en proceso de recuperación con coberturas vegetativas en zonas templadas de México. *Terra Latinoamericana*, 17(2):139-148.
- Boland, D.J., Brooker, M.I.H., Chippendale, G.M., Hall, N., Hyland, B.P.M., Johnson, R.D., Kleinig, D.A., McDonald, M.W. & Turner, J.D. (2006). *Forest Trees of Australia*. CSIRO Publishing, 5ta edición. Australia. 25 y 29 pp.

- Borda-Molina, D., Pardo-García, J.M., Martínez-Salgado, M.M. & Montaña-Lara, J.S. (2009). Producción de un biofertilizante a partir de un aislamiento de *Azotobacter nigricans* obtenido en un cultivo de *Stevia rebaudiana* Bert. *Universitas Scientiarum*, 14(1):71-78.
- Bozzola, J.J. & Russell, L.D. (1999). Electron Microscopy: Principles and Techniques for Biologists. 2da. Ed. Jones & Bartlett Publishers, 50 pp.
- Bradford, K.J. (1995). Water relations in seed germination. In: Seed Development and Germination. Jaime Kigel y Gad Galili (Ed). Editorial Marcel Dekker, Inc. New York, USA, 351-396 pp.
- Brewer, L.J. & Sullivan, D.M. (2003). Maturity and stability evaluation of composted yard trimmings. *Compost Science & Utilization*, 11(2):96-112.
- Camelo, M., Vera, S.P. & Bonilla, R.R. (2011). Mecanismos de acción de las rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal. *Revista Corpoica-Ciencia y Tecnología Agropecuaria*, 12(2):159-166.
- Campbell, N.A. & Reece, J.B. (2007). Biología. 7ma. Edición, Ed. Médica Panamericana, Madrid, España, 713-715 pp.
- Carvajal-Muñoz, J.S. & Mera-Benavides, A.C. (2010). Fertilización biológica: técnicas de vanguardia para el desarrollo agrícola sostenible. *Producción + Limpia*, 5(2):77-96.
- Castellanos-Ruelas, A.F., Murguía-Olmedo, M.L. & Moguel-Ordoñez, Y.B. (2000). Efecto del deshidratado sobre el valor nutritivo de la pollinaza y la presencia de microorganismos. *Técnica Pecuaria en México*, 38(3):219-230.
- Celis-Bautista, L.X. & Gallardo-Echeverri, I.R. (2008). Estandarización de métodos de detección para promotores de crecimiento vegetal (ácido indol acético y giberelinas) en cultivos microbianos. Pontifica Universidad Javeriana. Tesis para optar al grado de Microbiólogo Agrícola y Veterinario. Bogotá, D.C. Colombia. 24, 153-155 pp.
- Céspedes-Payret, C. (2007). Dinámica de la materia orgánica y de algunos parámetros fisicoquímicos en molisoles, en la conversión de una pradera a cultivo forestal en la región de Piedras Coloradas-Algorta (URUGUAY). Institut National Polytechnique de Toulouse. Tesis para optar al grado de doctor. Toulouse, Francia. 25 pp.
- Chen, Y.L., Kang, L.H. & Dell, B. (2006). Inoculation of *Eucalyptus urophylla* with spores of *Sclerotinia* in a nursery in south China: Comparison of field soil and potting mix. *Forest Ecology and Management*, 222:439-449.
- Cherkasov, N., Ibhaden, A.O. & Fitzpatrick, P. (2015). A review of the existing and alternative methods for greener nitrogen fixation. *Chemical Engineering and Processing*, 90:24-33.

- Chirinos, J.; Leal, A. & Montilla J. (2006). Uso de insumos biológicos como alternativa para la agricultura sostenible en la zona sur del estado Anzoátegui. *Revista CENIAP HOY*, 11:1-7.
- Collados-Clares, C. (2006). Impacto de inoculantes basados en *Azospirillum* modificado genéticamente sobre la diversidad y actividad de los hongos de la micorriza arbuscular en rizósfera de trigo y maíz. Universidad de Granada, Facultad de Ciencias. Tesis para optar al grado de Doctor. Granada. 9 pp.
- CONABIO. 2012. Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad. Portal de Geoinformación, Sistema Nacional de Información sobre Biodiversidad. Mapa: División política estatal. (Disponible en: www.conabio.gob.mx).
- CONAFOR. (2015). Comisión Nacional Forestal. Temas forestales: Certificación forestal. (Disponible en: www.conafor.gob.mx).
- Córdova-Bautista, Y., Rivera-Cruz, M.C., Ferrera-Cerrato, R., Obrador-Olán, J.J. & Córdova-Ávalos, V. (2009). Detección de bacterias benéficas en suelo con banano (*Musa AAA Simmonds*) cultivar "Gran enano" y su potencial para integrar un biofertilizante. *Universidad y Ciencia*, 25(3):253-265.
- Córdova-Sánchez, S., Cárdenas-Navarro, R., Peña-Cabriales, J.J., Salgado-García, S., Castelán-Estrada, M., Lobbit-Phellipe, C. & Vera-Núñez, J.A. (2013). Fijación biológica de nitrógeno por cuatro fabáceas en suelos ácidos de Tabasco, México. *Rev. FCA UNCUIYO*, 45(1):1-9.
- Croes, C.L., Moens, S., Bastelaere, E.V., Vanderleyden, J. & Michiels, K.W. (1993). The polar flagellum mediates *Azospirillum brasilense* adsorption to wheat roots. *J. Gen. Microbiol.*, 139:2261-2269.
- Curtis, H. & Schnek, A. (2008). Biología. Ed. Médica Panamericana, 7ª edición, Buenos Aires, Argentina. 112-113, 854, 863 pp.
- De Barros, N.F. (1997). Nutrição e Adubação de Eucalipto. *Inf. Agropec.*, 18(186):70-80.
- De Bashan, L.E.; Holguin, G.; Glick, B.R. & Bashan, Y. (2007). Bacterias promotoras de crecimiento en plantas para propósitos agrícolas y ambientales. En: Ferrera-Cerrato, R. y Alarcón, A. (Eds.). *Microbiología agrícola: hongos, bacteria, micro y macrofauna, Control biológico, Planta-microorganismo*. Trillas, México. 177-224 pp.
- De Weger, L.A., Van Arendonk, J., Recourt, K., Van Der Hofstad, G., Weissbeek, P. & Lugtemberg, B. (1998). Siderophore-mediated uptake of Fe³⁺ by the plant growth-stimulating *Pseudomonas putida* Strain WCS358 and by other rhizosphere microorganisms. *J. Bacteriol.*, 170(10):4693-4698.
- Díaz, K., Valiente, C., Martínez, M., Castillo, M. & Sanfuentes, E. (2009). Root promoting rhizobacteria in *Eucalyptus globulus* cuttings. *World J Microbiol Biotechnol*, 25:867-873.

- Díaz-Peralta, K., Araya, T., Valenzuela, S., Sossa, K., Martínez, M., Peña-Cortés, H. & Sanfuentes, E. (2012). Production of phytohormones, siderophores and population fluctuation of two root-promoting rhizobacteria in *Eucalyptus globulus* cuttings. *World J Microbiol Biotechnol*, 28:2003-2014.
- Dimkpa, C., Weinand, T. & Asch, F. (2009). Plant-rhizobacteria interactions alleviate abiotic stress conditions. *Plant Cell Environ.*, 32:1682-1694.
- Dobbelaere, S., Croonenborghs, A., Thys, A., Ptacek, D., Vanderleyden, J., Dutto P., Labandera-Gonzalez, C., Caballero-Mellado, J.J., Aguirre, J.F., Kapulnik, Y; Berner, S., Burdman, S., Kadouri, D., Sarig, S. & Okon, Y. (2001). Responses of agronomically important crops to inoculation with *Azospirillum*. *Australian Journal of Plant Physiology*, 28:871-879.
- Dobbelaere, S., Vanderleyden, J. & Okon, Y. (2003). Plant growth-promoting effects of diazotrophs in the rhizosphere. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 22(2):107-149.
- Döbereiner, J., Urquiaga, S., Boddey, R.M. & Ahmad, N. (1995). Alternatives for nitrogen of crops in tropical agriculture. Nitrogen Economy in tropical Soil. *Fertilizar Research*, 42:339-346.
- Dodd, G. & Donovan, L. (1999). Water potential and ionic effects on germination and seedling growth of two cold desert shrubs. *Am J Bot.*, 86(8):1146-1153.
- Doporto-Alfaro, R.A. (2014). Arvenses en una plantación de eucalipto (*Eucalyptus pellita* F. Muell) en Huimanguillo, Tabasco, México. Colegio de Postgraduados, Campus Tabasco. Tesis para optar al grado de maestro en ciencias. H. Cárdenas, Tabasco, México. 8-11 pp.
- Dunstan, W.A., Malajczuk, N. & Dell, B. (1998). Effects of bacteria on mycorrhizal development and growth of container grown *Eucalyptus diversicolor* F. Muell. Seedlings. *Plant and Soil*, 201:241-249.
- Dykstra, M.J. (1993). Routine schedule for the preparation of cell and tissue samples for scanning electron microscopy. En: Plenum Press (Ed). *Manual of applied techniques for biological electron microscopy biological*. New York. 18-20 pp.
- Egas-Yerovi, J.J. (2010). Efecto de la inoculación con *Azotobacter* sp. en el crecimiento de plantas injertadas de cacao (*Theobroma cacao*), genotipo nacional, en la provincia de Esmeraldas. Escuela Politécnica Nacional, Facultad de ingeniería química y agroindustria. Tesis para optar al grado de ingeniero agroindustrial. Quito, Ecuador.
- Espinoza-Espinoza, J.R. & Almaguer-Vargas, G. (2007). Estimación de biomasa de órganos aéreos de plantas de manzana CV. Agua Nueva 2. *Revista Chapingo, Serie Horticultura*, 13(2):179-184.
- Estrada-Bonilla, G.A., Bonilla-Buitrago, R.R. & Divan-Baldani, V.L. (2009). Efecto de diferentes temperaturas de almacenamiento sobre la calidad de bioinoculantes turbosos. *Corpoica Cienc. Tecnol. Agropecu.*, 10(2):205-213.

- Estrada-Pareja, M. M. (2005). Manejo y procesamiento de la gallinaza. *Revista Lasallista de Investigación*, 2(1):43-48.
- Faccini, G., Garzón, S., Martínez, M. & Varela, A. (2007). Evaluation of the effect of a dual inoculum of phosphate-solubilizing bacteria and *Azotobacter chroococcum*, in crops of creole potato (papa "criolla"), "yema de huevo" variety (*Solanum phureja*). *Developments in Plant and Soil Sciences*, 102:301-308.
- FAO. (1981). Food and Agriculture Organization. El *Eucalyptus* en la repoblación forestal. Serie Montes 11. Roma, Italia. 171, 204 pp.
- temeh, A., Masoud, T., Pejman, A. & Aidin, H. (2014). Effect of plant growth promoting rhizobacteria (PGPRs) and stratification on germination traits of *Crataegus pseudoheterophylla* Pojark. *Sedes. Scientia Horticulturae*, 172:61-67.
- Felker, P., Medina, D., Soulier, C., Velicce, G., Velarde, M. & Gonzalez, C. (2005). A survey of environmental and biological factors (*Azospirillum* spp, *Agrobacterium rhizogenes*, *Pseudomonas aurantiaca*) for their influence in rooting cuttings of *Prosopis alba* clones. *Journal of Arid Environments*, 61:227-247.
- Ferrera-Cerrato, R. & Alarcón, A. (2001). La microbiología del suelo en la agricultura sostenible. *Ciencia Ergo Sum*, 8(2):175-183.
- Forrester, D.I. (2013a). Growth responses to thinning, pruning and fertiliser application in *Eucalyptus* plantations: A review of their production ecology and interactions. *Forest Ecology and Management*, 310:336-347.
- Forrester, D.I., Collopy, J.J., Beadle, C.L. & Baker, T.G. (2012a). Interactive effects of simultaneously applied thinning, pruning and fertiliser application treatments on growth, biomass production and crown architecture in a young *Eucalyptus nitens* plantation. *Forest Ecology and Management*, 267:104-116.
- Forrester, D.I., Collopy, J.J., Beadle, C.L. & Baker, T.G. (2013b). Effect of thinning, pruning and nitrogen fertiliser application on light interception and light-use efficiency in a young *Eucalyptus nitens* plantation. *Forest Ecology and Management*, 288:21-30.
- Forrester, D.I., Collopy, J.J., Beadle, C.L., Warren, C.R. & Baker, T.G. (2012b). Effect of thinning, pruning and nitrogen fertiliser application on transpiration, photosynthesis and water-use efficiency in a young *Eucalyptus nitens* plantation. *Forest Ecology and Management*, 266:286-300.
- Franco-Correa, M. (2008). Evaluación de caracteres PGPR en actinomicetos e interacciones de estas rizobacterias con hongos formadores de micorrizas. Universidad de Granada. Tesis para optar al grado de doctor. Granada. 46-52 pp.
- Gaitán, J.J., Larocca, F. & Dalla, F. (2004). Fertilización de *Eucalyptus grandis*: dinámica de la respuesta durante la rotación comercial. XIX Congreso Argentino de la Ciencia del Suelo y II Simposio Nacional sobre Suelos Vertisólicos, Paraná.

- García-Albarado, J.C., Trejo-Tellez, L.I., Velásquez-Hernández, M.A., Ruiz-Bello, A. & Gómez-Merino, F.C. (2010). Crecimiento de petunia en respuesta a diferentes proporciones de composta en sustrato. *Revista Chapingo*, Serie horticultura, 16(2):107-113.
- García, M.A. & De La Peña, C. (2013). Respuesta a la fertilización de otoño en plantaciones de eucalipto en Entre Ríos Quebracho. *Revista de Ciencias Forestales*, 21(12):16-25.
- García-Saavedra, M.J. & Vicente-García, J.C. (2003). Esterilización. En: Paraninfo (Ed). *Técnicas de descontaminación: limpieza, desinfección, esterilización*. Madrid, España. 85-110 pp.
- García-Serrano, P., Ruano-Criado, S., Lucena-Marotta, J.J. & Nogales-García, M. (2010). Fertilización Nitrogenada. En: Ministerio de Medio Ambiente y Medio Rural y Marino (Ed). *Guía práctica de la fertilización racional de los cultivos en España*. España. 67-72 pp.
- Garrrity, G., Brenner, D.J., Krieg, N. R. & Staley, J.R. (2006). *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology: Volume 2: The Proteobacteria*. Second edition. Michigan, USA. 7-27 pp.
- Geilfus, F. (1994). Los Eucaliptos. En: ENDA-CARIBE/CATIE (Ed.). *El árbol al servicio del agricultor: manual de agroforestería para el desarrollo rural, Volumen 2: Guía de especies*. Manual técnico No. 9. Turrialba, Costa Rica. 429 pp.
- Glick, B.R. (2012). Plant Growth-Promoting Bacteria: Mechanisms and Applications. *Scientifica*, 2012:1-16.
- Glick, B.R., (1995). The enhancement plant growth free-living bacteria. *Canadian. J. Microbiol.*, 41:109-117.
- Glick, B.R., Patten, C.L., Holguin, G. & Penrose, D.M. (1999). Biocontrol Mechanism. In: Biochemical and genetic mechanism used by plant growth promoting bacteria. Ontario Canada. Imperial Collage Press. 270, 215-248 pp.
- Gliessman, S. (2002). Agroecología: procesos ecológicos en agricultura sostenible. CATIE (Ed). Turrialba, Costa Rica. 111, 202, 233 pp.
- Gómez-Luna, B.E., Hernández-Morales, A., Herrera-Méndez, C.H., Arroyo-Figueroa, G., Vargas-Rodríguez, L. & Olalde-Portugal, V. (2012). Aislamiento de bacterias promotoras del crecimiento de la rizósfera de plantas de guayaba (*Psidium guajava*). *Ra Ximhai*, 8(3):97-102.
- Gonçalves-Mafia, R., Couto-Alfenas, A., Maria-Ferreira, E., Do Amaral-Teixeira, D. & Valverde-Zauza, E.A. (2007). Indução do enraizamento e crescimento do eucalipto por rizobactérias: efeito da adição de fonte alimentar e da composição do substrato de enraizamento. *Revista Árvore*, 31(4):589-597.

- González-Coloma, A., Reina, M., Díaz, C.E., Fraga, B.M. & Santana-Meridas, O. (2010). Natural Product-Based Biopesticides for Insect Control. *Comprehensive Natural Products II, Chemistry and Biology*, 3:237-268.
- González-Mancilla, A., Rivera-Cruz, M. del C., Ortiz-García, C.F., Almaraz-Suárez, J.J., Trujillo-Narcía, A. & Cruz-Navarro, G. (2013). Uso de fertilizantes orgánicos para la mejora de propiedades químicas y microbiológicas del suelo y del crecimiento del cítrico *Citrange troyer*. *Universidad y Ciencia, Trópico Húmedo*. 28(2):123-139.
- González-Río, F., Castellanos, A., Fernández, O. & Gómez, C. (1997). Manual técnico de selvicultura del eucalipto. Edición HTML y multimedia: Proyecto Agrobyte.
- Gorai, M. & Neffati, M. (2007). Germination responses of *Reaumuria vermiculata* to salinity and temperature. *Anna Appl Biol.*, 151(1):53-59.
- Guerra-Bugueño, E.R. (2012). Estudio de factores que incrementan la rentabilidad de plantaciones pulpables de *Eucalyptus Globulus* Labill en Chile. Universidad de Córdoba. Tesis para optar al grado de doctor. Córdoba, España. 10-14 pp.
- Guerrero-Ortiz, P.L., Quintero-Lizaola, R., Espinoza-Hernández, V., Benedicto-Valdés, G.S. & Sánchez-Colín, M. de J. (2012). Respiración de CO₂ como indicador de la actividad microbiana en abonos orgánicos de *Lupinus*. *Terra Latinoamericana*, 30(4):355-362.
- Hartman, A. (2005). Prof. Dr. Lorenz Hiltner, a Pioneer in soil bacteriology and rhizosphere research. Hartman A, M. Schmid, WW Wenzel, P Hinsinger (Ed.). Rhizosphere 2004: perspectives and challenges-a tribute to Lorenz Hiltner. GSF-Forschungszentrum, Bericht. Neurenberg. 1-4 pp.
- Herbert, M.A. (1983). The response to *Eucalyptus grandis* to fertilising with nitrogen, Phosphorus, Potassium and Dolomitic Lime on a Mispah Soil Series. *S. Afr. For. J.*, 124:4-12.
- Hernández-Martínez, A. & Martínez-Salinas, A.J. (2011). Formulación de un inoculante microbiano para el crecimiento máximo de biomasa fijadora de nitrógeno. Universidad Juárez Autónoma de Tabasco. Tesis para optar al grado de Ingeniero Químico. Cunduacán, Tab., México.
- Holguín, G., Bashan, Y. & Ferrera-Cerrato, R. (1996). Interacciones entre plantas y microorganismos benéficos. III. Procedimientos para el aislamiento y caracterización de hongos micorrízicos y rizobacterias promotoras del crecimiento de plantas. *Terra*, 14:211-224.
- Huang, W., Hu, T., Chen, H., Wang, Q., Hu, H., Tu, L. & Jing, L. (2013). Impact of decomposing *Cinnamomum septentrionale* leaf litter on the growth of *Eucalyptus grandis* saplings. *Plant Physiology and Biochemistry*, 70:411-417.
- IFA. (2013). International Fertilizer Association. Statistics databases, Production and International Trade - PIT. (Disponible en: www.fertilizer.org)

- Illmer, P. & Shinner, F. (1995). Solubilization of inorganic calcium phosphates. Solubilization mechanisms. *Soil Biology and Biochemistry*, 27(3):257-263.
- INEGI. (2007). Instituto Nacional de Estadística, Geografía e Informática. Estados Unidos Mexicanos. Censo agropecuario 2007. Superficie según el tipo de tecnología empleada en unidades de producción que reportan corte de árboles por entidad y municipio.
- INEGI. (2008). Instituto Nacional de Estadística, Geografía e Informática. Prontuario de información geográfica municipal de los Estados Unidos Mexicanos, Huimanguillo, Tabasco. Clave geoestadística 27008.
- INEGI. (2015a). Instituto Nacional de Estadística, Geografía e Informática. Información nacional, por entidad federativa y municipios. Huimanguillo, Tabasco.
- INEGI. (2015b). Instituto Nacional de Estadística, Geografía e Informática. Información nacional, por entidad federativa y municipios. Cunduacán, Tabasco.
- INFOR. (2010). Datos tecnológicos del *Eucalyptus nitens*: Recurso, Mercado y Propuesta de manejo. Instituto Forestal. Documentos técnicos. Número 1.
- Isaza-Arias, G.C., Pérez-Méndez, M.A., Laines-Canepa, J.R. & Castañón-Nájera, G. (2009). Comparación de dos técnicas de aireación en la degradación de la materia orgánica. *Universidad y ciencia*, 25(3):233-243.
- Jiménez-Avellana, D.J. (2007). Caracterización molecular de cepas nativas colombianas de *Azotobacter spp* mediante el análisis de restricción del DNA ribosomal 16S. Pontifica Universidad Javeriana. Tesis para optar al grado de Microbiólogo Industrial. Bogotá, D.C. Colombia. 11-17 pp.
- Karthikeyan, A. & Sakthivel, K.M. (2011). Efficacy of *Azotobacter chroococcum* in rooting and growth of *Eucalyptus camaldulensis* stem cuttings. *Res. J. Microbiol.* 6(7):618-624.
- Keuter, A., Veldkamp, E. & Corre, M. (2014). Asymbiotic biological nitrogen fixation in a temperate grassland as affected by management practices. *Soil Biology & Biochemistry*, 70:38-46.
- Klooster, D. (2000). Institutional choice, community, and struggle: a case study of Forest co-management in México. World Deve. 65 pp.
- Kowaljow, E., Mazzarino, M.J., Satti, P. & Jiménez-Rodríguez, C. (2010). Organic and inorganic fertilizer effects on a degraded Patagonian rangeland. *Plant and Soil*, 332(1-2):135-145.
- Kuss, A.V. (2006). Fixação de nitrogênio por bacterias diazotróficas em cultivares de arroz irrigado. Universida de Federal de Santa Maria. Tese de Doutorado. Santa María, RS, Brasil. 76 pp.
- La Sala, A.V. (2006). Pre-commercial thinning and fertiliser enhance growth in young native *Eucalyptus obliqua* (L'Hérit.) stands in Tasmania. *Australian Forestry*, 69:16-24.

- Lara-Mantilla, C., Villalba-Anaya, M. & Oviedo-Zumaqué, L.E. (2007). Bacterias fijadoras asimbióticas de nitrógeno de la zona agrícola de San Carlos. Córdoba, Colombia. *Rev. Colomb. Biotecnol.*, 9(2): 6-14.
- León-González, Y., Hernández-Martínez, J.M., Rodríguez-López, N. & Martínez-Viera, R. (2012). Aplicación de *Azotobacter chroococcum* en la producción de plántulas de tabaco negro. *Cultivos Tropicales*, 33(2):29-32.
- Liu, F., Xing, S., Ma, H., Du, Z. & Ma, B. (2013). Plant growth-promoting rhizobacteria affect the growth and nutrient uptake of *Fraxinus americana* container seedlings. *Appl Microbiol. Biotechnol.*, 97:4617-4625.
- Loon, L.C. (2007). Plant responses to plant growth-promoting rhizobacteria. *Eur. J. Plant Pathol.*, 119:243-254.
- López, M., Martínez-Viera, R., Brossard-Fabre, M., Bolívar, A., Alfonso, N., Alba, A. & Pereira-Abreo, H. (2008). Efecto de biofertilizantes bacterianos sobre el crecimiento de un cultivar de maíz en dos suelos contrastantes venezolanos. *Agronomía Tropical*. 58(4):391-401.
- López, M., Martínez-Viera, R., Brossard-Fabré, M. & Toro, M. (2010). Capacidad de fijación de nitrógeno atmosférico de cepas nativas de agroecosistemas venezolanos. *Agronomía Tropical*, 60(4):355-361.
- Loredo-Osti, C., Beltrán-López, S. & Peña-Del Rio, M. de los A. (2007). Uso de biofertilizantes para la producción de maíz forrajero en condiciones de temporal. Folleto científico Núm. 2. Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias. Centro de Investigación Regional del Noreste. Campo Experimental San Luís. 60 pp.
- Lucy, M., Reed, E. & Glick, B.R. (2004). Applications of free living plant growth-promoting rhizobacteria. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 86:1-25.
- Madigan, M.T., Martinko, J.M., Stahl, A. & Clark, D.P. (2012). *Brock. Biology of microorganisms*. 13a Edición. Editorial Pearson Higher Education. Madrid, España. 31,35, 168-169, 460-461, 669-671, 866-875, 1152 pp.
- Madrid, C. & Castellanos, Y. (1998). Efecto de activadores sobre la calidad de compost elaborados con cachaza y bagazo de la caña de azúcar. *Revista Venezuelos*, 1(2): 22-28.
- Manoharachary, C. & Mukerji, G.K. (2006). Rhizosphere biology-an overview. En: *Microbial Activity in the Rhizosphere*. Springer-Verlag (Ed), Berlin Heidelberg. 1-38 pp.
- Markov, S.A., Protasov, E.S., Bybin, V.A., Eivazova, E.R. & Stom, D.I. (2015). Using immobilized cyanobacteria and culture medium contaminated with ammonium for H₂ production in a hollow-fiber photobioreactor. *International journal of hydrogen energy*, 30:1-6.

- Marschner, P., Crowley, D. & Hong-Yang, C. (2004). Development of specific rhizosphere bacterial communities in relation to plant species, nutrition and soil type. *Plant and Soil*, 261:199-208.
- Martínez-Ruiz, R., Azpiroz-Rivero, H.S., Rodríguez-De la O, J.L., Cetina-Alcalá, V.M. & Gutiérrez-Espinoza, M.A. (2006). Importancia de las plantaciones forestales de Eucalyptus. *Ra Ximhai*, 2(3):815-846.
- Martínez-Viera, R., Dibut, B. & Ríos, Y. (2010). Efecto de la integración de aplicaciones agrícolas de biofertilizantes y fertilizantes minerales sobre las relaciones suelo-planta. *Cultivos Tropicales*, 31(3):27-31.
- Mason, P.A., Ingleby, K., Munro, R.C., Wilson, J. & Ibrahim, K. (2000). The effect of reduced phosphorus concentration on mycorrhizal development and growth of *Eucalyptus globulus* Labill. seedlings inoculated with 10 different fungi. *Forest Ecology and Management*, 128:249-258.
- Materan, M., Coopman, R., Ríos, R. & Sánchez, M. (2004). Efecto del estrés nutricional de N sobre el crecimiento de plantas de *Eucalyptus globulus* Labill. Segundo Congreso Chileno de Ciencias Forestales. Valdivia. Chile.
- Mavrodi, O.V., Mavrodi, D., Park, A., Weller, D. & Thomashow, L. (2006). The role of *dsbA* in colonization of the wheat rhizosphere by *Pseudomonas fluorescens* Q8r1-96. *Microbiol.*, 152:863-872.
- Mayz-Figueroa, J. (2004). Fijación biológica de nitrógeno. *Revista UDO Agrícola*, 4(1):1-20.
- Medina-Sierra, M. (2012). Caracterización bioquímica y microbiológica de un suelo de pradera de *Dactylis glomerata* y *Medicago Sativa* bajo diferentes proporciones de siembra. Universidad de Salamanca (Ed). 14-25 pp.
- Mendonça-Vita Reis, A., De Araújo-Carneiro, J.G., Guerra-Barroso, D., Ribeiro-Santiago, A., Aparecida-Rodrigues, L. & Aparecida-Souares de Freitas, T. (2007). Características biométricas de mudas de *Eucalyptus* sp sob estresse salino. *Revista Árvore*, 31(3):365-372.
- Messina, M.G. (1992). Response of *Eucalyptus regnans* F. Muell. to thinning and urea fertilization in New-Zealand. *Forest Ecology and Management*, 51:269-283.
- Mikkelsen, R.L. (2010). Biuret in Urea Fertilizers. *Better Crops*, 91(3):6-7.
- Minitab Inc., (2003). Meet MINITAB Release 14 for Windows ®. Primera Ed. USA, Minitab Inc.
- Mohammad, G. & Prasad, R. (1998). Influence of microbial fertilizers on biomass accumulation in polypotted *Eucalyptus calmadulensis*. *J Trop For.*, 4:74-77.
- Monsalve, J., Escobar, R., Acevedo, M., Sánchez, M. & Coopman, R. (2009). Efecto de la concentración de nitrógeno sobre atributos morfológicos, potencial de crecimiento radical y estatus nutricional en plantas de *Eucalyptus globulus* producidas a raíz cubierta. *Bosque*, 30(2):88-94.

- Montgomery, D.C. (2002). Diseño y análisis de experimentos, Alianza Editorial, Madrid.
- Morales-Ibarra, M. (2008). Los biofertilizantes, una alternativa productiva, económica y sustentable. Artículo de análisis, Procuraduría Agraria, México.
- Moreno, J., López, G., & Siche, R. (2010). Modelación y optimización del proceso de extracción de aceite esencial de eucalipto (*Eucalyptus globulus*). *Scientia Agropecuaria*, 1:147-154.
- Moreno, L. & Galvis, F. (2013). Potencial biofertilizante de bacterias diazótrofes aisladas de muestras de suelo rizosférico. *Pastos y Forrajes*, 36(1):33-37.
- Murray-Núñez, R.M., Bojórquez-Serrano, J.I., Hernández-Jiménez, A., Orozco-Benítez, M.G., García-Paredes, J.D., Gómez-Aguilar, R., Ontiveros-Guerra, H.M. & Aguirre-Ortega, J. (2011). Efecto de la materia orgánica sobre las propiedades físicas del suelo en un sistema agroforestal de la llanura costera norte de Nayarit, México. *Revista Bio Ciencias*, 1(3):27-35.
- Nahm, K.H. (2003). Evaluation of the nitrogen content in poultry manure. *World's Poultry Science Journal*, 59(1):77-88.
- Narula, N., Kukreja, K., Kumar, V. & Lakshminarayana, K. (2002). Phosphate solubilization by soil isolates of *Azotobacter chroococcum* and their survival at different temperaturas. *Journal of Agriculture in the Tropics and Subtropics*, 103(1):81-87.
- Narula, N., Kumar, V., Behl, R.K., Deubel, A., Gransee, A. & Merbach, W. (2004). Effect of P-solubilizing *Azotobacter chroococcum* on N, P, K uptake in P-responsive wheat genotypes grown under greenhouse conditions. *Journal of Plant Nutrition and Soil Science*, 163(4):393-398.
- NAS. (1983). National Academy of Sciences. *Eucalyptus pellita*. En: Firewood Crops: Shrub and Tree Species for Energy Production: Report of an Ad Hoc Panel of the Advisory Committee on Technology Innovation, Board on Science and Technology for International Development, Commission on International Relations, Volumen 2. Washington, D.C. 84 pp.
- Nosrati, R., Owlia, P., Sadari, H., Rasooli, I. & Malboobi, M.A. (2014). Phosphate solubilization characteristics of efficient nitrogen fixing soil *Azotobacter* strains. *Iran. J. Microbiol.*, 6(4):285-295.
- Obando-Castellanos, D.M., Burgos-Zabala, L.B., Rivera-Botía, D.M., Rubiano-Garrido, M.F., Divan-Baldani, V.L. & Bonilla-Buitrago, R.R. (2010). Caracterización de bacterias diazotróficas asimbióticas asociadas al eucalipto (*Eucalyptus* sp.) en Codazzi, Cesar (Colombia). *Acta Biol. Colomb.*, 15(3):107-120.
- Ojeda-Morales, M.E. (2009). Determinación de parámetros (temperatura, pH y nutrientes) para la producción óptima de biomasa microbiana hidrocarbonoclasta en condiciones in vitro. Universidad Juárez Autónoma de

- Tabasco. Tesis para optar al grado de Maestro en Ingeniería y Protección Ambiental. Villahermosa, Tab., México.
- Orozco, G.G., Muñoz, H.J., Villaseñor, F.J., Rueda, S.A., Sigala, J.A. & Prieto, J.A. (2010). Diagnóstico de calidad de planta en los viveros forestales del estado de Colima. SAGARPA. INIFAP. CIRPAC. Campo Experimental Uruapan, Michoacán, México. 10 p.
- Orozco-Jaramillo, C. & Martínez-Nieto, P. (2009). Evaluación de la inoculación con microorganismos fijadores de nitrógeno asimbióticos aislados de la rizósfera de *Pinus patula* en Colombia. *Bosque (Valdivia)*, 30(2):70-77.
- Ortiz, V.B. & Ortiz, C.A. (1990). Edafología. Universidad Autónoma Chapingo. Departamento de Suelos. Séptima edición. Chapingo, México.
- Öztürk, M.S., Baslar, Y., Dogan, M. & Sakcali, M. (2006). Alleviation of salinity stress in the seeds of some *Brassica species*. En: Ajmal Khan M y Weber D, editores. *Ecophysiology of High Salinity Tolerant Plants*. Chapter 10.
- Palma-López D.J., Cisneros-Domínguez J., Moreno-Cáliz E. & Rincón-Ramírez J. A. (2006). Plan de uso sustentable de los suelos de Tabasco. Volumen 1, 3ra. Edición. Instituto para el Desarrollo de Sistemas de Producción del Trópico Húmedo de Tabasco (ISPROTAB)-Fundación Produce Tabasco A.C.-Colegio de Postgraduados. Villahermosa, Tab., México. 18-19 pp.
- 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 shortgrowing-season area. *European Journal of Agronomy*, 11:179-186.
- Paredes-Mendoza, M. & Espinosa, V. (2010). Ácidos orgánicos producidos por rizobacterias que solubilizan fosfato: una revisión crítica. *Terra Latinoamericana*, 28(1):61-70.
- Patiño-Torres, C.O. & Sanclemente-Reyes, O.E. (2014). Los microorganismos solubilizadores de fósforo (MSF): una alternativa biotecnológica para una agricultura sostenible. *Entramado*, 10(2):288-297.
- Patten, C. & Glick, B. (2002). Role of *Pseudomonas putida* indoleacetic acid in development of the host plant root system. *Appl Environ Microbiol*, 68:3795-3801.
- Pereg-Gerk, L., Paquelin, A., Gounon, P., Kennedy, I.R. & Elmerich, C. (1998). A transcriptional regulator of the LuxR-UhpA family, FlcA, controls flocculation and wheat root surface colonization by *Azospirillum brasilense* Sp7. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 11(3):177-187.
- Pérez-Sandoval, R. (2010). Características edafológicas y potencial productivo de *Eucalyptus urophylla* y *E. grandis* en Huimanguillo Tabasco. Colegio de postgraduados. Tesis para optar al grado de maestro en ciencias. Montecillo, Texcoco, Edo. De México. 22 pp.

- Pérez-Vera, O.A., Yáñez-Morales, M. de J., Alvarado-Rosales, D., Cibrián-Tovar, D. & García-Díaz, S.E. (2005). Hongos asociados a eucalipto, *Eucalyptus grandis* Hill: Maid. *Agrociencia*, 39:311-318.
- Ping, L. & Boland, W. (2004). Signals from the undergroup: bacterial volatiles promote growth in *Arabidopsis*. *Trends Plant Sci.*, 9:263-266.
- Pino, A., Repetto, C., Mori, C. & Perdomo, C. (2008). Patrones de descomposición de estiércoles en el suelo. *Terra Latinoamericana*, 26(1):43-52.
- Piña, M. & Arboleda, M.E. (2010). Efecto de dos ambientes lumínicos en el crecimiento inicial y calidad de plantas de *Crescentia cujete*. *Bioagro*, 22(1):61-66.
- Porta, M., López-Acevedo, R. & Roquero-De Laburu, C. (1999). Edafología para la agricultura y el medio ambiente. Mundi-Prensa. Madrid, España.
- Pozo-Peñaloza, E.R. (2005). Efecto de la fertilización sobre plantaciones de *Eucalyptus globulus* (Labill) y *Eucalyptus nitens* (Maiden) de siete años de edad en la comuna de máfil, provincia de Valdivia. Universidad de Chile. Tesis para optar el grado de Ingeniero Forestal. Santiago, Chile. 6 pp.
- Prado, J.A. & Barros, S. (1989). *Eucalyptus*, principios de silvicultura y manejo. INFOR, 199 pp.
- Prause, J. & Gallardo, L.F. (2000). Influencia de cuatro especies nativas sobre las propiedades físicas de un suelo forestal del parque Chaqueño Húmedo Argentina. Comunicaciones Científicas y Técnicas. UNNE. Argentina.
- Puente, M.L, García, J.E., Pathauer, P. & Peticari, A. (2010). Inoculation with *Azospirillum brasilense* is a useful tool in *Eucalyptus globulus* management. *American-Eurasian J. Agric. Environ. Sci.*, 8(2):124-130.
- Rangel-Lucio, J.A., Ramírez-Gama, R.M., Ortiz, F.C., Mendoza-Elos, M., García-Moya, E., & Rivera-Reyes, J.G. (2014). Biofertilización de *Azospirillum spp.* y rendimiento de grano de maíz, sorgo y trigo. *Revista De La Facultad De Ciencias Agrarias*, 46(2):231-238.
- Rao, M., Lee, H., Creelman, R., Mullet, J. & Davirs, K. (2000). Jasmonic acid signaling modulates ozone-induced hypersensitive cell death. *Plant Cell*, 12:1633-1646.
- Rao, P.A. & Krishna, K.G. (2006). Plant growth-promoting rhizobacteria. En: Gnanamanickam SS (ed) *Plant- Associated Bacteria*. Springer The Netherlands. 195-230 pp.
- Redel, Y., Rubio, R. & Borie, F. (2006). Efecto de la adición de residuos de cosecha y de un hongo micorrizógeno sobre el crecimiento de trigo y parámetros químicos y biológicos de un Andisol. *Agric. Téc.*, 66:174-184.
- Reed, S.C., Cleveland, C.C., Townsend, A.R. (2011). Functional ecology of free living nitrogen fixation: a contemporary perspective. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics*, 42:489-512.

- Reyes-Guzmán, R., Borboa-Flores, J., Cinco-Moroyoqui, F.J., Rosas-Burgos, E.C., Osuna-Amarillas, P.S., Wong-Corral, F.J., Ortega-Nieblas, M.M. & León-Lara, J.D. (2012). Actividad insecticida de aceites esenciales de dos especies de *Eucalyptus* sobre *Rhyzopertha dominica* y su efecto en enzimas digestivas de progenies. *Revista Chapingo, Serie Ciencias Forestales y del Ambiente*, 18(3):385-394.
- Reyes, I., Álvarez, L., El-Ayoubi, H. & Valery, A. (2008). Selección y evaluación de rizobacterias promotoras del crecimiento en pimentón y maíz. *Bioagro*, 20(1):37-48.
- Reyes, I. & Valery, A. (2007). Efecto de la fertilidad del suelo sobre la microbiota y la promoción del crecimiento del maíz (*Zea mays* L.) con *Azotobacter* spp. *Bioagro*, 19(3):117-126.
- Rivera-Cruz, M.C., Rivón-Hernández, P. & Trujillo-Narcía, A. (2011). Soportes orgánicos de bacterias promotoras de crecimiento vegetal y la sustentabilidad del suelo. *Terra Latinoamericana*, 29(2):179-188.
- Rivera-Cruz, M.C., Trujillo-Narcía, A. & Alejo-Pereyra, D.E. (2010). Los biofertilizantes integrados con bacterias fijadoras de N, solubilizadoras de P y sustratos orgánicos en el crecimiento de naranjo agrio *Citrus aurantium* L. *Interciencia*, 35(2):113-119.
- Rivera-Cruz, M.C., Trujillo-Narcía, A., Córdova, B.G., Kohler, J., Caravaca, F. & Roldán, A. (2008). Poultry manure and banana waste are effective biofertilizer carrier for promoting plant growth and soil sustainable in banana crops. *Soil Biol. Biochem.* 40:3092-3095.
- Riveros-Angarita, A.S. (2010). Inducción de resistencia en plantas Interacción: Planta-Patógeno. IICA (Ed). San José, Costa Rica. 149 pp.
- Rodríguez-Barrueco, C., Cervantes, E., Subbarao, N.S. & Rodríguez-Caceres, E. (1991). Growth promoting effect of *Azospirillum brasilense* on *Casuarina cunninghamiana* Miq. Seedlings. *Plant and Soil*, 135(1):121-124.
- Rodríguez-Chávez, J.L. (2008). Estudio de viabilidad para la instalación de una empresa productora de inoculantes bacterianos. Universidad Nacional Autónoma de México, Facultad de Ingeniería. Tesis para optar al grado de grado maestro en ingeniería. Cd. Universitaria, México. 1-7 pp.
- Rodríguez, H., González, T., Goire, I. & Bashan, Y. (2004). Gluconic acid production and phosphate solubilization by the plant growth-promoting bacterium *Azospirillum* spp. *Naturwissenschaften*, 91(11):552-555.
- Rojas-Sierra, J. & Moreno-Sarmiento, N. (2008). Producción y formulación de prototipos de un biofertilizante a partir de bacterias nativas asociadas al cultivo de arroz (*Oryza sativa*). *Revista Colombiana de Biotecnología*, 10(2):50-62.
- Rueda, P.E., Barrón, H.J. & Hallman, J. (2009). *Bacterias Promotoras del Crecimiento Vegetal*. 1a Ed. Plaza y Valdés. México. 141 pp.

- Saharan, B.S. & Nehra, V. (2011). Plant growth promoting rhizobacteria: a critical review. *Life Sci Med Res.*, 2011: LSMR-21.
- Salisbury, F.B. & Ross, C.W. (2000) *Fisiología de las Plantas 1. Célula: Agua, Soluciones y Superficies*. Paraninfo/Thomson. Madrid, España. 305 pp.
- Sánchez-Bernal, E. I., Ortega-Escobar, M., González-Hernández, V., Camacho-Escobar, M.A. & Kohashi-Shibata, J. (2008). Crecimiento de plantas de papa (*Solanum tuberosum* L.) cv. Alpha, inducido por diversas soluciones salinas. *Interciencia*, 33(9):643-650.
- Sánchez-De Prager, M. (2005). La rizósfera: Estrategia de colonización. En: Endomicorizas en Suelos Tropicales. Universidad Nacional de Colombia. 106-134 pp.
- Sánchez-De Prager, M. (2007). Las endomicorizas: expresión bioedáfica de importancia en el trópico. Universidad Nacional de Colombia, Sede Palmira: Facultad de Ciencias Agropecuarias (Ed). Colombia.
- Sánchez, P.A. & Swaminathan, S. (2005). Cutting world hunger in half. *Science*, 307:357-359.
- Santana, M. & Vásquez, C. (2002). Evaluación de cepas *Azotobacter spp* y de bacterias solubilizadoras de fosfato (BFS), como biofertilizante mixto en cultivo de crisantemo (*Chrysanthemum morifolium* var. *Regal Suerte*). Pontifica Universidad Javeriana. Tesis para optar al grado de Microbiólogo Industrial. Bogotá, D.C. Colombia. 24 pp.
- Santillana-Villanueva, N. (2006). Producción de biofertilizantes utilizando *Pseudomonas* sp. *Ecología Aplicada*, 5(1 y 2):87-91.
- Sarabia-Ochoa, M., Madrigal-Pedraza, R., Martínez-Trujillo, M. & Carreón-Abud, Y. (2010). Plantas, hongos micorrízicos y bacterias: su compleja red de interacciones. *Biológicas*, 12(1): 65-71.
- SAS Institute Inc. (2004). Paquete estadístico: StatisticalAnalysisSystemfor Windows, Versión 9.1.3. Copyright © 2004, SAS Institute Inc., Cary, NC, USA.
- Sastry, M.S.R., Sharma, A.K. & Johri, B.N. (2000). Effect of an AM fungal consortium and *Pseudomonas* on the growth and nutrient uptake of *Eucalyptus* hybrid. *Mycorrhiza*, 10:55-61.
- Sayed, W. F. (2011). Improving Casuarina growth and symbiosis with *Frankia* under different soil and environmental conditions-review. *Folia Microbiol.*, 56:1-9.
- Schönau, A.P.G. (1977). Initial responses to fertilizing *Eucalyptus grandis* at planting are sustained until harvesting. *S. Afr. For. J.*, 100:72-80.
- Schönau, A.P.G. & Pennefather, M. (1975). A first account of profits at harvesting as a result of fertilizing *Eucalyptus grandis* at time of planting in southern Africa. *S. Afr. For. J.*, 94:29-35.

- Seefeldt, L.C., Hoffman, B.M. & Dean, D.R. (2012). Electron transfer in nitrogenase catalysis. *Current Opinion in Chemical Biology*, 16:19-25.
- SEMARNAT. (2002a). Norma Oficial Mexicana NOM-021-SEMARNAT-2000. Apartado 6.1. Muestreo para determinar fertilidad de suelos. Diario Oficial de la Federación, segunda sección. Diciembre 2002.
- SEMARNAT. (2002b). Norma Oficial Mexicana NOM-021-SEMARNAT-2000. Apartado 7.1.1. Método AS-01. Preparación de la muestra de suelo. Diario Oficial de la Federación, segunda sección. Diciembre 2002.
- SEMARNAT. (2002c). Norma Oficial Mexicana NOM-021-SEMARNAT-2000. Apartado 7.3.17. Método AS-25. Determinación de nitrógeno total en el suelo. Diario Oficial de la Federación, segunda sección. Diciembre 2002.
- SEMARNAT. (2002d). Norma Oficial Mexicana NOM-021-SEMARNAT-2000. Apartado 7.1.11. Método AS-11. Determinación del fósforo extraíble en suelos neutros y ácidos. Diario Oficial de la Federación, segunda sección. Diciembre 2002.
- SEMARNAT. (2002e). Norma Oficial Mexicana NOM-021-SEMARNAT-2000. Apartado 7.1.7. Método AS-07. Determinación de materia orgánica del suelo. Diario Oficial de la Federación, segunda sección. Diciembre 2002.
- SEMARNAT. (2002f). Norma Oficial Mexicana NOM-021-SEMARNAT-2000. Apartado 7.1.2. Método AS-02. Determinación del pH del suelo medido en agua. Diario Oficial de la Federación, segunda sección. Diciembre 2002.
- SEMARNAT. (2002g). Norma Oficial Mexicana NOM-021-SEMARNAT-2000. Apartado 7.1.5. Método AS-05. Determinación del contenido de humedad del suelo por gravimetría. Diario Oficial de la Federación, segunda sección. Diciembre 2002.
- SEMARNAT. (2002h). Norma Oficial Mexicana NOM-021-SEMARNAT-2000. Apartado 7.2.5. Método AS-18. Medición de la conductividad eléctrica en el extracto de saturación. Diario Oficial de la Federación, segunda sección. Diciembre 2002.
- SEMARNAT. (2002i). Norma Oficial Mexicana NOM-021-SEMARNAT-2000. Apartado 7.1.3. Método AS-03. Determinación de la densidad aparente del suelo. Diario Oficial de la Federación, segunda sección. Diciembre 2002.
- Shriver, J.A., Carter, S.D., Sutton, A.L., Richert, B.T., Senne B.W. & Pettey, L.A. (2003). Effects of adding fiber sources to reduced-crude protein, amino acid-supplemented diets on nitrogen excretion, growth performance, and carcass traits of finishing pigs. *J. Anim. Sci.*, 81: 492-502.
- Shu, T., Ching, L. & Shang, Y. (2007). Microbial conversion of food wastes for biofertilizer production with thermophilic lipolytic microbes. *Renewable Energy*, 32:904-915.

- Sicardi, M., García-Préchac, F. & Frioni, L. (2004). Soil microbial indicators sensitive to land use conversion from pastures to commercial *Eucalyptus grandis* (Hill ex Maiden) plantations in Uruguay. *Applied Soil Ecology*, 27(2):125-133.
- Sierra-Bernal (2010). La urea: características, ventajas y desventajas de esta fuente nitrogenada. Ministerio de agricultura, Instituto de Investigaciones Agropecuarias, Centro Regional de Investigación Intihuasi. Chile. Informativo, N° 35.
- Silvestrini-Cordeiro, M.A., Corá, J.E. & Nahas, E. (2012). Atributos bioquímicos e químicos do solo rizosférico e não rizosférico de culturas em rotação no sistema de semeadura direta. *Revista Brasileira de Ciência do Solo*, 36(6):1794-1803.
- Slávik, M. (2005). Production of Norway spruce (*Picea abies* [L.] Karst.) seedlings on substrate mixes using growth stimulants. *Journal of Forest Science*, 51(1):15-23.
- Smethurst, P., Baillie, C., Cherry, M. & Holz, G. (2003). Fertilizer effects on LAI (leaf area index) and growth of four *E. nitens* plantations. *Forest Ecology and Management*, 176:531-542.
- Spaepen, S., Vanderleyden, J. & Remans, R. (2007). Indole-3-acetic acid in microbial and microorganism-plant signaling. *FEMS Microbiology Reviews*, 31(4): 425-448.
- SSA. (1995). Norma Oficial Mexicana NOM-110-SSA1-1994, bienes y servicios. Preparación y dilución de muestras de alimentos para su análisis microbiológico. Apartado 6.2 Materiales. Diario Oficial de la Federación. Mayo 1995.
- Steenhoudt, O. & Vanderleyden, J. (2000). *Azospirillum*, a free-living nitrogen-fixing bacterium closely associated with grasses: genetic, biochemical and ecological aspects. *FEMS Microbiol. Reviews*, 24: 487-506.
- Subba-Rao, N.S. (1999). *Soil Microbiology*. Fourth edition of soil microorganisms and plant growth. Ed. Science Publishers Inc., USA. 407 pp.
- Tahir, M., Mirza, M.S., Zaheer, A., Rocha-Dimitrov, M., Smidt, H. & Hameed, S. (2013). Isolation and identification of phosphate solubilizer *Azospirillum*, *Bacillus* and *Enterobacter* strains by 16SrRNA sequence analysis and their effect on growth of wheat (*Triticum aestivum* L.). *Australian Journal of Crop Science*, 7(9):1284-1292.
- Taller, B.J. & Wong, Y.T. (1989). Cytoquinins in *Azotobacter vinelandii* culture médium. *Appl Environ Microbiol*, 55(1):266-267.
- Thomson, B., Ostle, N., McNmara, N., Bailey, M., Whiteley, A. & Griffiths, R. (2010). Vegetation affects the relative abundances of dominant soil bacterial taxa and soil respiration rates in an upland grassland soil. *Microbial Ecology*, (59):335-343.

- Torriente, D. (2010). Aplicación de bacterias promotoras del crecimiento vegetal en el cultivo de la caña de azúcar. Perspectivas de su uso en Cuba. *Cultivos Tropicales*, 31(1):19-26.
- Tortora, G.J., Funke, B.R & Case, C.L. (2007). Control del crecimiento microbiano. En: Médica Panamericana (Ed). *Introducción a la microbiología*. 9 na. Edición. Buenos Aires, Argentina. 187-198 pp.
- Tsavkelova, E.A., Klimova, S.Y., Cherdyntseva, T.A. & Netrusov, A.I. (2006). Microbial producers of plant growth stimulators and their practical use: a review. *Appl Biochem Microbiol*, 42(2):117-126.
- Unkovich, M. & Baldock, J. (2008). Measurement of asymbiotic N₂ fixation in Australian agriculture. *Soil Biology & Biochemistry*, 40:2915-2921.
- Uribe, S., Huerta, E., Geissen, V., Mendoza, M., Godoy, R. & Jarquín, A. (2012). *Pontoscolex corethrurus* (Annelida: Oligochaeta) indicador de la calidad del suelo en sitios de *Eucalyptus grandis* (Myrtaceae) con manejo tumba y quema. *Rev. Biol. Trop.*, 60(4):1543-1552.
- Urzúa, H. (2005). Beneficios de la Fijación Simbiótica de Nitrógeno en Chile. *Cien. Inv. Agr.* 32(2):133-150.
- Vázquez-Nin, G. & Echeverría, O. (2000). Microscopia electrónica de barrido. En: Casa del Libro (Ed). *Introducción a la Microscopía Electrónica Aplicada a Las Ciencias Biológicas*. Universidad Nacional Autónoma de México, México, D.F. 109 pp.
- Vessey, J.K. (2003). Plant growth promoting rhizobacteria as biofertilizers. *Plant Soil*, 255:571-586.
- Villa-Castro, L., Mayek-Pérez, N., García-Olivares, J.G., & Hernández-Mendoza, J.L. (2014). Efecto de la inoculación en maíz con cepas nativas de *Azospirillum* sp. *Avances en Investigación Agropecuaria*, 18(1):33-38.
- Voinnet, O. (2005). RNA silencing compared with innate immunity. *Nature Rev Gen*, 6:206-220.
- Warnock, R., Valenzuela, J., Trujillo, A., Madriz, P. & Gutiérrez, M. (2006). Área foliar, componentes del área foliar y rendimiento de seis genotipos de caoba. *Agronomía Tropical*. 56(1):21-42.
- Whippis, J. (2001). Microbial interactions ADN biocontrol in the rhizosphere. *J. Exp. Bot.*, 52:487-511.
- Wiseman, D., Pinkard, E., Wardlaw, T., Mohammed, C., Hall, M. & Beadle, C., (2009). Growth responses of *Eucalyptus globulus* and *E. nitens* to pruning and fertiliser treatments in a plantation managed for solid-wood products. *Southern Forests*, 71:21-29.
- Wu, S.C., Cao, Z.H., Li, Z.G., Cheung, K.C. & Wong, M.H. (2005). Effects of biofertilizer containing N-fixer, P and K solubilizers and AM fungi on maize growth: a green house trial. *Geoderma*, 125:155-166.

- Zaady, E. & Perevolotskyb, A. (1995). Enhancement of growth and establishment of oak seedlings (*Quercus ithaburensis* Decaisne) by inoculation with *Azospirillum brasilense*. *Forest Ecology and Management*, 72:81-83.
- Zambrano, J.A & Díaz, L.A. (2008). Efecto de la inoculación de *Azospirillum brasilense* y *Glomus* sp. en *Gmelina arborea* durante su germinación y manejo en vivero. *Universitas Scientiarum*, 13(2):162-170.
- Zeng, L.S., Liao, M., Chen, C.L. & Huang, C.Y. (2007). Effects of lead contamination on soil enzymatic activities, microbial biomass, and rice physiological indices in soil-lead-rice (*Oryza sativa* L.) system. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 67(1): 67-74.
- Zubillaga, M.S., Branzini, A. & Lavado, R.S. (2008). Problemas de fitotoxicidad en compost. *Pilquen-Sec. Agronomía*, 10(9).

ANEXOS

Anexo A1. Muestreo para determinar fertilidad de suelos de acuerdo a la NOM-021-SEMARNAT-2000.

El muestreo de suelos es un procedimiento para la obtención de una o más muestras representativas en un terreno. El muestreo se realizará con base en los parámetros a ser evaluados. Mediante el muestreo la heterogeneidad de los parámetros del suelo a ser evaluados pueden ser estimados en su valor promedio, colectando un determinado número de muestras o de muestras compuestas derivadas de submuestras.

Equipo y material

El material y equipo mínimo necesario para la colecta de muestras de suelo en campo.

1. Barrena de cilindro cerrado o pala recta. La herramienta de muestreo debe garantizar que la muestra obtenida tenga el mismo volumen en espesor y profundidad, de un tamaño suficiente que facilite y permita la formación de las muestras compuestas, que sea fácil de limpiar, resistente al desgaste, útil en suelos arenosos secos y en arcillosos húmedos, y que no contamine las muestras con impurezas.
2. La barrena debe ser fácil de manejar y permitir rapidez en el muestreo.
3. Bolsas de plástico transparente con capacidad para dos kilogramos de suelo.
4. Marcadores de tinta indeleble.
5. Libreta de notas y bolígrafo.
6. Plano, mapa o fotografía aérea de la zona de muestreo.

Procedimiento

1. Subdivisión de unidades de muestreo

- 1.1. Establecer objetivos para definir las unidades de muestreo.
- 1.2. La unidad de muestreo debe ser un área donde el tipo de suelo en cuanto a textura, color, pendiente, cultivo, manejo, etc., sea aparentemente homogéneo.
- 1.3. Disminuir la heterogeneidad de los atributos que se van a determinar, delimitando las unidades de muestreo o áreas aparentemente homogéneas en el terreno.
- 1.4. Las unidades de muestreo pueden tener una extensión de dos a ocho hectáreas o más si el área en cuestión es muy homogénea. Unidades de muestreo menores a dos hectáreas pueden considerarse cuando el muestreo se practica para cultivos económicamente redituables y mayores a ocho hectáreas cuando se trata de terrenos visualmente homogéneos y manejados de manera uniforme.

2. Número de submuestras

Se ha observado que las muestras individuales pueden presentar mayor variación y consumen más tiempo y recursos económicos que las muestras compuestas, por lo que resulta más conveniente colectar y analizar muestras compuestas.

- 2.1 El número de muestras individuales que deben componer una muestra compuesta varía entre 15 y 40, dependiendo de la heterogeneidad y tamaño de la unidad de

muestreo, aunque el número de submuestras es independiente del tamaño de la población.

2.2 Cuando la unidad de muestreo alcance una extensión entre dos y ocho hectáreas se podrán coleccionar entre 10 y 25 submuestras, conservando precisión. De manera práctica se ha calculado que la máxima precisión en el muestreo se puede alcanzar al coleccionar hasta 40 submuestras por muestra.

3. Ubicación de sitios de muestreo

3.1 Existen varios procedimientos para definir el sitio de colecta de la muestra, siendo el más práctico el muestreo en zigzag, a lo largo de una línea dentro de la unidad de muestreo.

3.2 El muestreo en zigzag inicia por un lado del terreno, escogiendo al azar el punto de partida para definir el plano de muestreo que cubra homogéneamente la unidad de muestreo.

3.3 Ya definido el plano de muestreo se decide la distancia entre los diferentes puntos de muestreo, en relación con el número de submuestras elegido según el objetivo del muestreo.

4. Profundidad de muestreo

4.1 La profundidad del muestreo se determina en función del objetivo que se persigue.

4.2 Cuando el muestreo es para evaluar la fertilidad de los suelos se debe hacer un muestreo a la profundidad de máxima exploración radical del cultivo en cuestión.

4.3 Generalmente, el muestreo en la mayoría de los cultivos se recomienda realizar a una profundidad entre 0-20 o 0-30 cm.

4.4 Particularmente, del muestreo de suelos con pastos o prados se sugiere hacer un muestreo a una profundidad entre 5 a 10 cm.

4.5 En frutales la recomendación es hacer un muestreo a intervalos de 30 cm hasta el sitio de máxima densidad de raíces.

4.6 En el caso de suelos con sales el muestreo se realiza a la profundidad donde germina la semilla, es decir, de cero a cinco cm.

4.7 Es importante señalar que las profundidades a las que se ha hecho referencia, comienzan a contar después de haber removido los residuos orgánicos no descompuestos.

5. Muestra compuesta

5.1 La muestra compuesta se debe preparar con submuestras que contengan un mismo volumen de suelo y podrán ser sometidas a un buen proceso de homogeneización.

5.2 La homogeneización de las submuestras debe realizarse dentro de una tina de plástico, con capacidad para 30 kilogramos de suelo, evitando la contaminación con otros materiales.

5.3 El mezclado dentro de la tina de plástico se realiza con una pala de aluminio o de acero inoxidable, de uso manual.

5.4 Después del mezclado de las muestras se forma una torta circular, la que se divide en cuatro partes iguales, de las cuales se desechan dos cuartos opuestos y con los dos restantes se repite el proceso de mezclado indicado anteriormente.

5.5 Repetir el proceso tantas veces como sea necesario, hasta que la muestra final tenga un peso de 1.5 kg.

5.6 La homogeneización de las submuestras puede realizarse en campo cuando se tienen muchas submuestras o en el laboratorio si la cantidad de submuestras es pequeña.

Informe

Debe incluir la información que se indica a continuación:

1. Nombre del productor o interesado.
2. Clave de identificación del lugar donde fue colectada la muestra, si fuera posible sobre un plano o mapa referenciado.
3. Nombre del cultivo establecido o con qué fines se realiza el muestreo.
4. Identificación propia de la muestra.
5. Fecha de colecta de la prueba.

Comentarios

1. Es importante conocer más acerca de la historia del terreno a muestrear y del cultivo, datos como fórmula de fertilización edáfica o foliar, dosis aplicadas, época de aplicación, manejo en general del suelo y del cultivo, rendimientos promedios del cultivo y características climáticas y de relieve de la región.

Cuando esta información se obtiene previa al muestreo, es de gran utilidad para definir las unidades de muestreo.

2. Se debe cuidar que los materiales y herramientas utilizados en el muestreo no adicionen sustancias o elementos extraños que puedan aumentar la concentración de algún nutrimento en la muestra o que los sustraigan.

Anexo A2. Preparación de la muestra de suelo a través del método AS-01 de la NOM-021-SEMARNAT-2000.

Principio y aplicación

Método de preparación de las muestras de suelo con el propósito de caracterizarlo y/o almacenarlo para posteriormente utilizarlo para el mismo propósito. Una vez obtenida la muestra de suelo debe ser llevada al laboratorio en donde deberá ser preparada, para posteriormente someterla a los procesos de análisis correspondientes.

La preparación de la muestra es tan importante como el muestreo y análisis de la misma, ya que los errores cometidos en este proceso pueden invalidar el resultado del análisis químico. La preparación de la muestra de suelo incluye el traslado, recepción, registro, secado, molienda, tamizado, homogeneizado, y el almacenamiento para su conservación. Con el propósito de evitar la contaminación de la muestra de suelo y asegurar mayor precisión y exactitud en el resultado del análisis, se deberá realizar esta operación en un lugar especial y limpio.

Material y equipo

1. Etiquetas.
2. Hojas de plástico de 40 x 70 cm.
3. Mazo de madera.
4. Cilindro de madera.
5. Libreta de registro.
6. Tamices de acero inoxidable de malla < 2 mm.
7. Frascos de vidrio de 1 litro o cajas de cartón de 2.0 kg de capacidad.

Procedimiento

1. Traslado de la muestra al laboratorio

1. Una vez obtenida la muestra en el campo, ésta debe ser cuidadosamente mezclada y reducidas de tamaño las partículas más grandes.
2. Cada muestra debe ir acompañada de una identificación, donde se indique claramente su procedencia, nombre del interesado, profundidad de colecta, relieve, cultivo, historial de fertilización, aplicación de mejoradores, etc., así como las determinaciones requeridas, según el propósito del estudio.
3. Durante el traslado es necesario evitar el efecto de factores como la humedad exterior, O₂, CO₂, luz, calor y otros materiales que puedan cambiar la naturaleza de la muestra.
4. Se debe evitar manejar la muestra con materiales que puedan contaminarla, como por ejemplo: recipientes que se oxiden, cintas adhesivas, etc.

2. Recepción y registro

1. Al llegar las muestras al laboratorio deberán registrarse con la identificación de campo y una lista de las determinaciones requeridas, incluyendo los métodos.
2. La identificación de campo de la muestra debe incluir los siguientes datos: (a) nombre del interesado; (b) procedencia; (c) fecha del muestreo; (d) número de muestras o submuestras; (e) profundidad de colecta; (f) pendiente del terreno; (g) manejo del terreno, etc.
3. El laboratorio asignará un número de registro a cada muestra, registro que conviene se realice con números seriados, para facilidad del manejo interno.

3. Secado

1. El secado se realiza con el propósito de facilitar el manejo de la muestra, mejorar la homogeneización y disminuir los cambios químicos indeseables.
2. Las muestras de suelo se secarán al ambiente.
3. El secado debe realizarse extendiendo la muestra de suelo sobre una superficie que no contamine. Puede secarse sobre charolas de plástico, vidrio, aluminio, fibra de vidrio o sobre una superficie de polietileno o papel.
4. La muestra debe extenderse logrando una profundidad inferior de 2.5 cm, colocarse a la sombra a una temperatura no mayor a 35°C y una humedad relativa entre 30 y 70%.

4. Molienda

1. Para realizar la molienda, deben retirarse con anticipación de la muestra, las rocas y el material orgánico visible.
2. La molienda se realiza con un mazo de madera.

5. Tamizado

1. El suelo molido se hace pasar por un tamiz con aberturas de dos mm de diámetro (malla 10) de acero inoxidable. Este grado de fineza es conveniente para la mayoría de los análisis requeridos con el propósito de diagnosticar la fertilidad de un suelo.
2. Una vez tamizado el material se separa 1.5 kg de suelo, cantidad suficiente para realizar las determinaciones químicas y físicas que permitirán caracterizar el suelo desde el punto de vista de su fertilidad.

6. Homogeneizado

1. Este paso es necesario para evitar sesgo en la selección de la submuestra que va a ser destinada para las determinaciones analíticas.
2. El homogeneizado puede lograrse utilizando bolsas de plástico (pueden ser las mismas donde estaban originalmente las muestras), haciendo girar la muestra en todas direcciones.

7. Pesado

Tamizada y debidamente homogeneizada la muestra de suelo se extrae la submuestra que va a ser utilizada para cada una de las determinaciones analíticas. Esto debe realizarse con espátulas y con la ayuda de pinceles de pelo de camello para limpiar completamente la espátula. La submuestra extraída debe ser pesada con balanza de precisión, de preferencia con aproximación de 0.1%, con respecto a la magnitud de la pesada que se desea realizar.

8. Almacenamiento

1. Una vez que las determinaciones analíticas han sido realizadas, las muestras deben almacenarse para posteriores comprobaciones u otros usos. Para esto pueden ser utilizados los frascos de vidrio o de plástico perfectamente cerrados, para disminuir los cambios químicos.
2. Estos recipientes deben permanecer herméticamente cerrados y debidamente clasificados. Para esto se recomienda conservar el número de registro del laboratorio, junto con la fineza del material.

Anexo A3. Determinación de nitrógeno total del suelo a través del método AS-25 de la NOM-021-SEMARNAT-2000.

Principios y aplicaciones

Método para la determinación de nitrógeno total del suelo. El nitrógeno total se determina frecuentemente en los análisis de rutina, sin embargo, es escasa su utilidad como indicador de la disponibilidad del nitrógeno en el suelo por las plantas, debido a que la mayor parte del nitrógeno se encuentra en forma orgánica con muy bajas tasas de mineralización. Se referencia como índice de las reservas orgánicas, en la estratificación de sistemas productivos y en los balances en el suelo.

La determinación de nitrógeno total por este procedimiento involucra dos pasos: (a) digestión de la muestra para convertir el nitrógeno a NH_4^+ y (b) la determinación de NH_4^+ en el digestado. La digestión de la muestra es desarrollada por calentamiento de la muestra con ácido sulfúrico concentrado y sustancias como el K_2SO_4 que promueve la oxidación de la materia orgánica y la conversión del nitrógeno orgánico a amonio por incremento de la temperatura de digestión y también emplean catalizadores como el Cu y el Se, que aumenta la velocidad de oxidación de la materia orgánica por el ácido sulfúrico. El amonio en el digestado es determinado por titulación del amonio liberado por destilación del digestado con álcali.

Reactivos

1. Ácido sulfúrico concentrado.
2. Solución de ácido bórico con indicador. Colocar 80 g de ácido bórico (H_3BO_3) en un frasco de 5 L de capacidad en el cual se ha marcado el nivel de 4 L, adicionar 3.8 L de agua destilada, calentar y agitar hasta la completa disolución de ácido. Enfriar la solución y agregar 80 mL de la siguiente mezcla de indicadores: 0.099 g de verde de bromocresol y 0.066 g de rojo de metilo disuelto en 100 mL de alcohol etílico al 95%. El pH de la mezcla (H_3BO_3)- indicador debe ser aproximadamente 5.0. Si fuese más ácido agregar gotas de NaOH 0.1 N hasta que la solución adquiriera una coloración púrpura rojiza o se alcance el pH indicado. Completar a 4 L con agua destilada y mezclar vigorosamente.
3. Mezcla de catalizadores- K_2SO_4 . Mezclar perfectamente 1 kg K_2SO_4 , 100 g de CuSO_4 , 5 H_2O y 10 g de selenio metálico. La mezcla debe homogenizarse completamente para evitar agregación de las partículas de los componentes.
4. Hidróxido de sodio 10 N. colocar 4 Kg NaOH en un botellón de vidrios pyrex de pared gruesa de aproximadamente 10 L de capacidad. Adicionar 4 L de agua destilada y rotar el botellón hasta que el hidróxido se disuelva. Dejar que la solución se enfríe en el depósito al cual se debe proveer de una tapa para evitar la absorción de CO_2 ambiente. Dejar decantar durante la noche, o más si es necesario, y sifonar el sobrenadante a otro botellón marcado a 10 L que contiene 1.5 L de agua destilada libre de CO_2 (hervida). Completar el volumen indicado de igual calidad y agitar vigorosamente. El hidróxido de sodio debe protegerse de CO_2 atmosférico utilizando 1 L de ascarita o cualquier otro.
5. Ácido sulfúrico 0.01 N. diluir 1 L de ácido sulfúrico 0.05 N (1.4 mL por litro) a 5 L con agua destilada. Estandarizar con Na_2CO_3 seco. Pesar 0.250 g de sal y disolver en un matraz de 50 mL. Llevar a volumen. Titular 3 alícuotas de esta solución de 10 mL cada una, usando 5 o 6 gotas de anaranjado de metilo como indicador. Calcular la Normalidad mediante la fórmula siguiente:

$$\text{Normalidad (H}_2\text{SO}_4\text{)} = (0.025\text{g}/53) \times (1/v \text{ H}_2\text{SO}_4).$$

V= volúmenes de ácido sulfúrico gastado en la titulación, expresado en litros.

Material y equipo

1. Balanza analítica.
2. Matraces semi-micro Kjeldahl de 50 mL.
3. Aparato de digestión semi-micro Kjeldahl.
4. Destilador con arrastre de vapor.
5. Matraces Erlenmeyer de 125 mL.
6. Microbureta de 10 mL.

Procedimiento

1. Colocar una muestra de suelo previamente tamizado a través de maya 60 y que contenga aproximadamente 1 mg de N. en un frasco micro Kjeldahl seco (1, 0.5, y 0.25 g de muestra para suelos con 2, 4 y 8 % de materia orgánica, respectivamente).
2. Adicionar 1.1 g de mezcla de catalizadores K_2SO_4 , 3 mL de ácido sulfúrico concentrado, calentar en la unidad digestora a temperatura media alta hasta que el digestado se torne claro.
3. Ebulir la muestra por una hora a partir del momento en que se torne claro. La temperatura debe regularse de modo que los vapores de ácido sulfúrico se condensen en el tercio inferior del cuello del tubo de digestión.
4. Una vez completada esta fase, deja enfriar el frasco y agregar suficiente agua para agregar una suspensión, mediante agitación, el digestado (15 a 20 mL son generalmente suficiente).
5. Dejar decantar las partículas de Sílice evitando la precipitación de cristales de sulfato de amonio.
6. Transferir el contenido líquido a la cámara de destilación del aparato, lavando el matraz de digestión con pequeñas porciones de agua.
7. Colocar en el tubo de salida del aparato de digestión un matraz Erlenmeyer de 125 mL conteniendo 10 mL de la solución H_3BO_3 + indicadores.
8. Adicionar cuidadosamente 10 mL NaOH 10 N de modo que la sosa se deposite en el fondo de la cámara de destilación.
9. Conectar el flujo de vapor e iniciar la destilación. Destilar hasta que el volumen alcance la marca de los 75 mL en el frasco Erlenmeyer.
10. Determinar el nitrógeno amoniacal presente en el destilado titulando con el ácido sulfúrico 0.01 N. debe usarse una microbureta de 10 mL con graduaciones de 0.01 mL. El cambio de color de la mezclas de indicadores en el punto final de la titulación, es de verde a rosado fuerte. Se preparan blancos siguiendo exactamente el mismo procedimiento que en las muestras.

Cálculos

$$\% \text{ N total} = (V_m - V_b) \times N \times 14/p \times 10$$

Donde:

V_m = Volumen de ácido sulfúrico empleado en la titulación de la muestra.

V_b = Volumen de ácido sulfúrico empleado en la titulación del blanco.

N = Normalidad exacta del ácido sulfúrico.

14 = Peso equivalente del nitrógeno.

p = Peso de la muestra del suelo en gramos.

Informe de la prueba

El contenido de N total en el suelo se expresa en términos de porcentaje en peso de la muestra. Se recomienda el uso de 2 cifras decimales. Debe especificarse en el reporte el método de análisis empleado.

Interpretación de resultados de nitrógeno total

Los resultados de los análisis de nitrógeno total pueden interpretarse con el siguiente cuadro:

Clase	Nitrógeno total %
Muy bajo	< 0.05
Bajo	0.05 – 0.10
Medio	0.10 – 0.15
Alto	0.15 – 0.25
Muy alto	> 0.25

Para suelos volcánicos se recomienda el empleo del siguiente cuadro

Clase	Nitrógeno total %
Bajo	< 0.30
Medio	0.30 – 0.80
Alto	> 0.80

Anexo A4. Determinación del fósforo extraíble en suelos neutros y ácidos a través del método AS-11 de la NOM-021-SEMARNAT-2000.

Principio y aplicación

Este método, es ampliamente utilizado en estudios de fertilidad de suelos para la determinación de fósforo disponible en suelos ácidos. El fósforo determinado con este procedimiento ha mostrado una estrecha relación con la respuesta de los cultivos. La solución extractora de P consiste de una combinación de HCl y NH_4F la cual remueve formas de P ácido solubles como los fosfatos de calcio y una porción de fosfatos de aluminio y hierro. El NH_4F disuelve los fosfatos de aluminio y de hierro al formar un ion complejo con estos iones metálicos en solución ácida.

Reactivos

1. Solución de fluoruro de amonio 1 N. Disolver 37 g de NH_4F en agua destilada y diluir hasta un litro. Conservar esta solución en botella de polietileno.
2. Ácido clorhídrico 0.5 N. Diluir 20.4 ml de HCl concentrado hasta 500 ml con agua destilada.
3. Solución extractora Bray-kurtz 1. Mezclar 30 mL de la solución de fluoruro de amonio 1 N con 50 mL de la solución de ácido clorhídrico 0.5 N y diluir a un litro con agua destilada. La solución resultante es 0.03 N en NH_4F y 0.025 N en HCl y es estable por más de un año si se conserva en frasco de polietileno.
4. Solución de tartrato de antimonio y potasio al 0.5%. Pese 0.5 g de $\text{K}(\text{SbO})\text{C}_4\text{H}_4\text{O}_6 \cdot \frac{1}{2} \text{H}_2\text{O}$, transfíralo a un matraz volumétrico de 100 mL disuélvalo y afore con agua destilada.
5. Solución de molibdato de amonio $[(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}]$. Disolver 20 g de molibdato de amonio $[(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}]$ en 300 mL de agua destilada. Agregue lentamente bajo constante agitación y con cuidado, 450 mL de H_2SO_4 (14 N) (194.4 mL H_2SO_4) concentrado diluido a 500 mL con agua da una concentración de aproximadamente 14 N). Agregue 100 mL de una solución al 0.5% (p/v) de tartrato de antimonio y potasio. Diluya las mezclas a 1 litro con agua destilada. Este frasco se debe mantener tapado y con papel aluminio y protegido de la luz.
6. Solución reductora con ácido ascórbico. Disolver 0.50 g de ácido ascórbico con un poco de solución patrón de molibdato de amonio y aforar a 100 mL con la misma solución. Esta solución es preparada cada vez que se vaya a formar color.
7. Solución patrón de $200 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ de P. Disolver 0.8786 g de fosfato dihidrógeno de potasio (KH_2PO_4), seco al horno, en agua y diluirla a un litro. Esta solución contiene $200 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ y debe guardarse refrigerada en frasco de plástico o de vidrio blando (no Pyrex) para evitar contaminación con arsénico. Algunos autores recomiendan agregar antes de enrasar 25 mL de H_2SO_4 7 N, lo cual ayudará a su conservación indefinida.
8. Solución patrón de $10 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ de P. Diluir 10 mL (medidos con bureta) de la solución de $200 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ P en 200 mL con agua destilada.

Material y equipo

1. Tubos de polietileno de 50 mL.
2. Papel Whatman No. 42.
3. Balanza analítica.
4. Espectrofotómetro para hacer lecturas a 880 nm y celdas.
5. Agitador mecánico recíproco ajustado a 180 oscilaciones por minuto.

6. Bureta de 10 mL.
7. Matraces volumétricos de 50 mL.

Procedimiento

1. Pesar 2.5 g de suelo previamente tamizado por malla de 2 mm y colocarlo en un tubo de polietileno de 50 mL.
2. Adicionar 25 ml de la solución extractora taparlo.
3. Agitar la suspensión en agitador de acción recíproca regulado a 180 oscilaciones por minuto, por 5 min.
4. El extracto se filtra a través de papel Whatman No. 42 u otro de calidad similar. Debe recordarse que algunos papeles filtro pueden contener cantidades altas de fósforo.
5. Tomar una alícuota de 2 a 40 mL del extracto, dependiendo de la concentración de P en solución (alícuotas de 5 a 10 mL son en general adecuadas para suelos bajos y medios en P) y colocarla en un matraz aforado de 50 mL.
6. Adicionar agua hasta completar aproximadamente 40 ml. Si es que se usa una alícuota inferior a este volumen.
7. Agregar 5 ml de la solución reductora, agitar y completar a volumen.
8. Esperar 30 minutos y leer la intensidad de la absorción de luz a 882 nm (nanómetros).
9. Preparar blancos siguiendo el mismo procedimiento que en las muestras.
10. Preparar una curva de calibración que contenga puntos correspondientes a 0, 1.0, 2.0, 3.0, 4.0 y 5 mg·L⁻¹ de P. Para ello colocar en matraces aforados de 50 mL 0, 5, 10, 15, 20 y 25 ml de la solución de 10 mg·L⁻¹ de P y proseguir en la forma descrita para las muestras.
11. Adicionar un volumen de solución extractante igual a la alícuota empleada para medir en las muestras conocidas.
12. Llevar a aproximadamente 40 mL con agua y adicionar 5 mL de la solución reductora, agitar y completar a volumen.
13. Esperar 30 minutos y leer la intensidad de la absorción de luz a 862 nm (nanómetros).

Cálculos

$$P \text{ (mg·Kg}^{-1} \text{ de suelo)} = CC \times V_f/A \times V_i/p$$

Donde:

CC= mg·L⁻¹ de P en la solución. Se obtiene graficando la curva de calibración (absorbancia contra mg·L⁻¹) e interpolando en la misma los valores de absorbancia de las muestras analizadas a las cuales previamente se les ha restado el valor promedio de los blancos o por medio de una regresión simple.

Vf= volumen final de la solución colorimétrica, mL.

A= alícuota del extracto usado colorimetría, mL.

Vi= volumen de la solución empleada para hacer el extracto, mL.

p= peso de la muestra seca al aire.

Informe de la prueba

Los resultados del contenido de P disponible en el suelo se reportan en miligramos por kilogramo de suelo (mg·Kg⁻¹). Se recomienda el uso de una cifra decimal. Adjunto al resultado debe hacerse referencia al método empleado.

Interpretación de resultados de fósforo Bray y Kurtz 1

Los resultados de los análisis de suelos pueden ser interpretados de manera aproximada con el siguiente cuadro.

Clase	mg·Kg ⁻¹ de P
Bajo	< 15
Medio	15-30
Alto	> 30

Es necesario considerar que para cada condición climática y cultivo existe un nivel diferente de aprovechamiento del fósforo del suelo. Por lo que si se conocen los criterios de interpretación para algún suelo y cultivo determinado, éstos se reportarán junto con el resultado del análisis.

Anexo A5. Determinación de materia orgánica de suelo a través del método AS-07 de la NOM-021-SEMARNAT-2000.

Principio y aplicación

La determinación de materia orgánica del suelo se evalúa a través del contenido de carbono orgánico con el método de Walkley y Black. Este método se basa en la oxidación del carbono orgánico del suelo por medio de una disolución de dicromato de potasio y el calor de reacción que se genera al mezclarla con ácido sulfúrico concentrado. Después de un cierto tiempo de espera la mezcla se diluye, se adiciona ácido fosfórico para evitar interferencias de Fe^{3+} y el dicromato de potasio residual es valorado con sulfato ferroso. Con este procedimiento se detecta entre un 70 y 84% del carbón orgánico total por lo que es necesario introducir un factor de corrección, el cual puede variar entre suelo y suelo. En los suelos de México se recomienda utilizar el factor 1.298 (1/0.77).

Reactivos

Los reactivos que a continuación se mencionan deben ser grado analítico a menos que se indique otra cosa.

1. Dicromato de potasio 0.166 M o 1N. Disolver 48.82 g de $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ en agua destilada aforar a 1000 mL en un matraz volumétrico.
2. Ácido sulfúrico concentrado (H_2SO_4).
3. Ácido fosfórico concentrado (H_3PO_4).
4. Indicador de difenilamina. Disolver 0.5 g de difenilamina en 20 mL de agua y añadir 100 ml de ácido sulfúrico concentrado.
5. Sulfato ferroso 1.0 M (aproximadamente). Disolver 278 g de $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ en agua a la que previamente se le añadieron 80 ml de H_2SO_4 concentrado, enfriar y diluir a un litro. Esta solución debe ser valorada con $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ 1 N antes de realizar la determinación.

Material

Matraces Erlenmeyer de 500 mL
Bureta para $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ (50 mL)
Bureta para $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (50 mL)
Pipeta volumétrica (10 mL)
Probeta de vidrio (25 mL)

Procedimiento

1. Pesar 0.5 g de suelo seco y pasado por un tamiz de 0.5 mm y colocarlo en un matraz Erlenmeyer de 500 mL. Procesar un blanco con reactivos por triplicado.
2. Adicionar exactamente 10 mL de dicromato de potasio 1 N girando el matraz cuidadosamente para que entre en contacto con todo el suelo.
3. Agregar cuidadosamente con una bureta 20 mL de H_2SO_4 concentrado a la suspensión, girar nuevamente el matraz y agitar de esa forma durante un minuto.
4. Dejar reposar durante 30 minutos sobre una lámina de asbesto o sobre una mesa de madera, evitando las mesas de acero o cemento.
5. Añadir 200 mL de agua destilada.

6. Añadir 5 mL de H_3PO_4 concentrado.
7. Adicionar de 5 a 10 gotas del indicador de difenilamina.
8. Titular con la disolución de sulfato ferroso gota a gota hasta un punto final verde claro.

Cálculos

$$\% \text{ C Orgánico} = \left(\frac{B - T}{g} \right) (N) (0.39) \text{ mcf}$$

Donde:

B = Volumen de sulfato ferroso gastado para valorar el blanco de reactivos (mL).

T = Volumen de sulfato ferroso gastado para valorar la muestra (mL).

N = Normalidad exacta del sulfato ferroso (valorar por separado al momento de analizar las muestras).

g = Peso de la muestra empleada (g).

mcf = factor de corrección de humedad.

% Materia orgánica = % C Orgánico $\times$ 1.72

Observaciones

Si al añadir el dicromato de potasio al suelo la solución se torna verdosa o si se gastan menos de dos ml de sulfato ferroso al titular la muestra, se debe reducir el peso de la muestra a la mitad.

El factor 0.39 resulta de multiplicar $\frac{12}{4000} \times \frac{1}{0.77} \times 100 \equiv 0.39$

Dónde: $\frac{12}{4000}$ es el peso miliequivalente del C, $\frac{1}{0.77}$ es un factor de corrección debido a que se supone que el método sólo oxida 77% del C, y 100 es la conversión a porcentaje. En la mayoría de los laboratorios se sigue usando el factor de Van Benmelen de 1.724 para estimar la M.O. a partir de C orgánico, el cual resulta

de la suposición de que la M.O. contiene un 58% de C, $\frac{1}{0.58} = 1.724$

Alternativamente puede emplearse una solución de sulfato ferroso amónico 0.5N pesar 196.1 g de $\text{Fe}(\text{NH}_4)_2(\text{SO}_4)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, disolverlos en 800 mL de agua destilada con 20 mL de H_2SO_4 concentrado y diluir a 1 L. Se ha reportado que los cloruros reaccionan con el dicromato en este método. Se ha propuesto que su efecto sea corregido mediante:

$$C_c = C - \frac{\text{Cl}^-}{12}$$

Donde:

C_c = Contenido de C orgánico en el suelo en porcentaje.

C = Contenido de C orgánico determinado por el método en porcentaje.

Cl^- = Contenido de cloruros en el suelo en porcentaje alternatively, también se ha recomendado separar los cloruros por lavado o eliminar su efecto mediante la adición de 25 g de sulfato de plata por cada litro de ácido sulfúrico concentrado.

Interpretación de Resultados de Materia Orgánica

Los valores de referencia para clasificar la concentración de la materia orgánica en los suelos minerales y volcánicos se presenta en la Tabla siguiente:

Clase	Materia orgánica (%)	
	Suelos volcánicos	Suelos no volcánicos
Muy bajo	< 4.0	< 0.5
Bajo	4.1 - 6.0	0.6 - 1.5
Medio	6.1 - 10.9	1.6 - 3.5
Alto	11.0 - 16.0	3.6 - 6.0
Muy Alto	> 16.1	> 6.0

Anexo A6. Determinación del pH del suelo medido en agua a través del método AS-02 de la NOM-021-SEMARNAT- 2000.

Principio y aplicación

Método electrométrico para la determinación del pH en muestras de suelo en una solución de agua pura. La evaluación electrométrica del pH se basa en la determinación de la actividad del ion H mediante el uso de un electrodo cuya membrana es sensitiva al H. En el caso de los suelos el pH se mide potenciométricamente en la suspensión sobrenadante de una mezcla de relación suelo: agua, 1:2.

El pH es una de las mediciones más comunes e importantes en los análisis químicos rutinarios de suelo, ya que controla reacciones químicas y biológicas en el suelo. La determinación del pH es afectada por varios factores tales como: el tipo y cantidad de constituyentes orgánicos e inorgánicos que contribuyen a la acidez del suelo, la concentración de sales en la solución, la relación suelo: solución, la presión parcial de bióxido de carbono y el efecto de la suspensión asociado con el potencial de unión, etc.

Reactivos

Los reactivos utilizados en esta determinación deben ser grado analítico y el agua utilizada en la preparación de las soluciones debe ser destilada o desionizada.

1. Agua destilada o desionizada.
2. Soluciones reguladoras de referencia, pH 4.00, 7.00 y 10.00, las cuales se adquieren preparadas o concentradas para diluirse de acuerdo a la instrucción.

Estas soluciones deben estar a temperatura ambiente al momento de calibrar el medidor de pH.

Material y equipo

1. Potenciómetro o medidor de pH equipado con electrodo de vidrio en combinación con electrodo de referencia.
2. Balanza con 0.1 g de sensibilidad.
3. Frascos de vidrio o plástico transparente de boca ancha con capacidad de 50 a 100 mL.
4. Pipeta volumétrica de 20 mL.
5. Varilla de vidrio que sirva como agitador manual.
6. Piceta.
7. Cinta métrica.

Procedimiento

1. Pesar 10 g de suelo en un frasco de vidrio o plástico de boca ancha.
2. Adicionar 20 mL. de agua destilada al frasco conteniendo el suelo.
3. Con una varilla de vidrio, agitar manualmente la mezcla de suelo: agua a intervalos de 5 minutos, durante 30 minutos.
4. Dejar reposar durante 15 minutos.
5. Calibrar el medidor de pH con las soluciones reguladores pH 4.00 y 7.00 o 10.00 según el suelo, enjuagando con agua destilada los electrodos antes de iniciar las lecturas de las muestras.
6. Agite nuevamente la suspensión e introduzca el electrodo en la suspensión.

7. Registre el pH al momento en que la lectura se haya estabilizado.

Informe de la prueba

Debe incluir la información que a continuación se indica:

1. Datos completos de identificación de la muestra.
2. Reportar el valor con número entero y una cifra decimal.
3. Fecha de realización de la prueba.

Comentarios

1. Previo a la lectura calibrar el potenciómetro de pH con solución amortiguadora de referencia para los intervalos dentro de los cuales se va a medir.
2. Las soluciones amortiguadoras de referencia deben conservarse en refrigeración y colocarlas a temperatura ambiente al momento de la calibración del equipo.
3. No se deberá almacenar las soluciones amortiguadoras por mucho tiempo.
4. Muestras de suelo conteniendo una alta concentración de materia orgánica tiende a formar gruesos grumos cuando la relación suelo: solución es similar a la de un suelo mineral, en este caso se deberán de utilizar relaciones más amplias.

Interpretación de resultados

Para la clasificación del suelo en cuanto a su valor de pH se presenta el cuadro siguiente:

Clasificación	pH
Fuertemente ácido	< 5.0
Moderadamente ácido	5.1 – 6.5
Neutro	6.6 – 7.3
Medianamente alcalino	7.4 – 8.5
Fuertemente alcalino	>8.5

Anexo A7. Determinación del contenido de humedad del suelo a través del método AS-05 de la NOM 021-SEMARNAT-2000.

Principio y aplicación

Método gravimétrico para la determinación del contenido de humedad de los suelos, sean estos orgánicos o minerales. El método se basa en la medición o determinación de la cantidad de agua expresada en gramos que contiene una muestra de suelo. Esta masa de agua se referencia de la masa de suelo seco de la muestra. La determinación de la masa de agua se realiza por la diferencia en peso entre la masa de suelo húmedo y la masa de suelo seco. Se considera como suelo seco aquél secado a la estufa a 105°C hasta obtener un peso constante.

Material y equipo

Botes de aluminio para humedad

Estufa con circulación forzada de aire y temperatura controlada

Balanza con aproximación de 0.01 g

Pinzas

Desecador

Procedimiento

1. Lave y limpie perfectamente e identifique los botes de aluminio a utilizar.
2. Los botes con todo y tapa introdúzcalos a la estufa durante 8 horas como mínimo a una temperatura de 105°C posteriormente registre el peso y vuelva a introducir los botes a la estufa hasta que se logre un peso constante en las muestras, todo este procedimiento previo al enfriamiento de los botes que se colocan en un desecador.
3. Utilizando las pinzas, saque los botes del desecador de vacío hasta que se enfríen y péselos con todo y tapa, éste será el peso del bote (PB).
4. Obtenga la muestra deseada, se recomienda sean de 30 a 50 gramos, aproximadamente, y colóquela en el bote de aluminio, en caso de que la muestra vaya a ser transportada es necesario tapar y sellar herméticamente el bote con parafilm.
5. Pese el bote con el suelo húmedo, este peso deberá ser el peso del bote más el suelo húmedo (PB + Psh).
6. Destape el bote con el suelo húmedo, coloque la tapa en la parte inferior e introdúzcalo a la estufa a una temperatura de 105°C.
7. Después de 24 horas saque el bote de la estufa tápelo y colóquelo en el desecador de vacío hasta que se enfríe, posteriormente pese el bote con la muestra seca, este peso será el peso del bote más el peso del suelo seco (PB + Pss).
8. Vuelva a introducir el bote a la estufa y una hora después sáquelo, enfríe en un desecador y pese; repetir este procedimiento hasta obtener el peso constante.

Cálculos

Con los datos obtenidos en el procedimiento, aplicar la siguiente ecuación:

$$\Theta g = \left[\frac{(PB + Psh) - (PB + Pss)}{(PB + Pss) - PB} \right] * 100$$

Donde:

Θg = Contenido de humedad gravimétrica expresado en porcentaje (%).

PB = Peso del bote con tapa (g).

Psh = Peso de suelo húmedo (g).

PB + Psh = Peso del bote más peso del suelo húmedo (g).

PB + Pss = Peso del bote más peso del suelo seco (g).

Comentarios

En muestras de suelos orgánicos, el secado a 105°C puede producir pérdida de masa por oxidación y volatilización de componentes orgánicos. Sin embargo bajo este método esto es inevitable. El método gravimétrico tiene la ventaja de ser simple y no utilizar equipo sofisticado. La desventaja es que las mediciones no son *in situ* y el muestreo es destructivo al sitio.

Anexo A8. Medición de la conductividad eléctrica a través del método AS-18 de la NOM-021-SEMARNAT-2000.

Principio y aplicación

Método para la determinación de la conductividad eléctrica del extracto de saturación de un suelo por medición electrolítica y una celda de conductividad como sensor.

1. El término extracto de saturación se usa en este método para designar al extracto acuoso que se obtiene por filtración al vacío que se obtiene de una pasta de suelo saturado hecha con agua destilada.
2. El término sales solubles del suelo se usa en este método para referirnos a los constituyentes inorgánicos del suelo que son apreciablemente solubles en el agua.
3. La conductividad eléctrica o conductancia específica de una solución es el recíproco de la resistencia específica de una corriente alterna medida entre las caras opuestas de un centímetro cúbico de una solución acuosa a una temperatura específica.
4. La conductividad eléctrica del extracto de saturación (CEe) es uno de los índices más difundidos para evaluar la concentración salina del suelo a nivel de laboratorio.
5. El método es aplicable a suelos con amplio rango de valores de conductividad eléctrica del extracto de saturación.
6. El extracto se puede diluir si el valor de la conductividad está fuera del rango de medición del conductímetro usado.
7. La conductividad eléctrica es una medida de la capacidad de un material para transportar la corriente eléctrica. Una solución acuosa que contiene iones tiene esa habilidad. La conductividad de una solución electrolítica depende de la concentración total de iones presentes en agua, de la movilidad de cada uno de los iones disueltos, su valencia y de la temperatura a la que se hace la determinación.
8. El principio por el cual los instrumentos miden conductividad es simple: dos placas de conductividad o electrodos se sumergen a la muestra, se aplica un potencial o voltaje a través de las placas y se mide la corriente que fluye entre las placas.

La conductancia eléctrica (C) se determina a partir de los valores del voltaje (V) y la corriente (I):

$$C = \frac{I}{V}$$

La conductividad eléctrica (CE) se calcula multiplicando la conductancia medida por la constante de celda (L/A):

$$CE = C \times (L/A)$$

Donde:

L = longitud de la columna de líquido entre los electrodos (cm).

A = Área de los electrodos (cm²).

La celda de conductividad es la parte del circuito que entra en contacto con la muestra.

La conductividad eléctrica del extracto de saturación (CE) se reporta en decisiemens por metro (dS m^{-1})

Reactivos

1. Agua destilada.
2. Solución estándar de KCl 0.010 N. disolver 0.7455 g de KCl en agua destilada y aforar a un litro. La conductividad eléctrica de esta solución a 25°C es 1.412 dS m^{-1} .
3. Solución estándar de KCl 0.100 N. disolver 7.4555 g de KCl en agua destilada y aforar a 1 L. la conductividad eléctrica de esta solución a 25°C es 12.900 dS m^{-1} . Antes de usar los medidores de conductividad estos se deben calibrar a una conductividad estándar con una de las soluciones patrones indicadas más arriba. Escoja la solución que se aproxima a la conductividad para calibrar el medidor escoja la solución de K que más se aproxima a la conductividad de la muestra.
4. Solución para el mantenimiento de la celda de conductividad. Un electrodo sucio polarizado se debe limpiar para renovar la superficie activa de la celda. Consulte el manual instructivo para el mantenimiento de la celda específica.

Material y equipo

1. Actualmente existe en el mercado una diversidad de instrumentos para medir conductividad eléctrica de soluciones. Estos medidores difieren en su rango de operación, exactitud, forma de corregir las lecturas de conductividad a una temperatura específica y precisión, por lo que se recomienda seguir las instrucciones del fabricante para la manipulación del instrumento.
2. Medidor de conductividad de lectura directa.
3. Celda de conductividad del tipo flujo con compensación automática de temperatura.

Interferencias

1. La conductividad eléctrica del extracto de saturación aumenta cuando incrementa la temperatura razón por la cual los valores de la conductividad eléctrica deben ser corregidos a 25°C cuando son reportados.
2. Si el contenido de agua de la pasta saturada es mayor o menor que el correspondiente al punto de saturación las conductividades serán afectadas.
3. Para obtener resultados reproducibles los electrodos de la celda deben estar limpios y bien platinados.

Precisión y exactitud

Los valores de conductividad menores de uno son reportados con dos cifras decimales y los valores mayores de uno con tres cifras significativas en dS m^{-1} a 25°C .

Constante de celda

1. Si la conductividad eléctrica de la solución de referencia de KCl está incorporada dentro del medidor para lecturas directas de conductividad, siga las recomendaciones del fabricante para la calibración.

2. Si el medidor seleccionado requiere que la constante de celda sea calculada, siga las instrucciones del instructivo del instrumento.

Procedimiento

1. Lavar y llenar la celda de conductividad con solución de KCl.
2. Ajustar el medidor de conductividad para leer la conductividad estándar de la solución de KCl.
3. Lavar y llenar la celda con el extracto de saturación del suelo y leer la conductividad eléctrica del extracto corregido a 25°C.

Control de calidad

Todo laboratorio que use este método deberá desarrollar protocolos de control de calidad que permita monitorear continuamente el sesgo y la precisión de todas las determinaciones.

Informe de la prueba

Debe incluir lo siguiente:

- Identificación completa de la muestra.
- Conductividad eléctrica es decisimens por metro (dA m^{-1}) a 25°C.
- Referencia a este método de prueba.
- Fecha de la prueba.

Interpretación de conductividad eléctrica

CE dS m-1 a 25°C	Efectos
< 1.0	Efecto despreciable de la salinidad
1.1 – 2.0	Muy ligeramente salino
2.1 – 4.0	Moderadamente salino
4.1 – 8.0	Suelo salino
8.1 – 16.0	Fuertemente salino
>16.0	Muy fuertemente salino

Anexo A9. Determinación de la densidad aparente del suelo a través del método AS-03 de la NOM-021-SEMARNAT-2000.

Principio y aplicación

Método dl terrón parafinado para la determinación de la densidad aparente de los suelos. La densidad aparente de una muestra de suelo es calcula a partir del conocimiento de dos parámetros: la masa del suelo y el volumen total, es decir el volumen de los sólidos y el volumen ocupado por el espacio poroso. En el caso de la masa, este se conoce pesando la muestra (terrón) y en el caso del volumen, este es determinado de manera indirecta recubriendo el terrón con una capa de parafina y pesándolo sumergido en un líquido (agua).

Material y equipo

1. Terrones de suelo con un diámetro máximo de 2 cm.
2. Hilo de algodón para cocer ropa.
3. Parafina a punto de fusión (56-60°C).
4. Vaso de precipitado de 500 mL.
5. Termómetro.
6. Estufa.
7. Balanza analítica.

Procedimiento

1. Secar dos o tres terrones de aproximadamente dos cm a la estufa a 105°C hasta peso constante.
2. A uno de estos terrones atarle un hilo procurando que quede bien sujeto y en el otro extremo del hilo hacer una lazada para sujetarla al brazo del platillo de la balanza.
3. Pesar el terrón sujetando la lazada al brazo del platillo de la balanza, éste será el peso del terrón al aire (Pt) a.
4. Sumergir el terrón rápidamente en la parafina derretida a 60°C cuidando que quede totalmente cubierto por una capa delgada y uniforme.
5. Pesar el terrón parafinado al aire que será: (Ptp) a.
6. Pesar el terrón parafinado sumergido en el agua adecuando el interior de la balanza para que se registre únicamente el eso del terrón sumergido en el agua, que será (Ptp) w.

Cálculos

1. Volumen de agua desplazada por el terrón.

$$(Ptp) a - (Ptp) w = \text{considerando una } pw = 1 \text{ g/cm}^3 \text{ que es igual } (Vt + Vp)$$

2. $(Ptp) a - (Pt) a = \text{Peso de la parafina (Pp)}$
3. $Pp = Vp = \text{Volumen de la parafina (Vp)}$
4. $(Vt + Vp) - Vp = \text{Volumen del Terrón (Vt)}$

$$\frac{(Pt)a}{Vt} = \text{Densidad aparente}$$

ρ_w = densidad de agua

ρ_p = densidad de la parafina (0.99 g/cm³)

Comentarios

Corregir el valor de la densidad del agua por efecto de la temperatura, con el siguiente cuadro de equivalencias:

Relación de la densidad del agua con la temperatura

Temperatura (°C)	Densidad del agua (g/cm ³)	Temperatura (°C)	Densidad del agua (g/cm ³)
10	0.99970	24	0.99730
12	0.99950	26	0.99678
14	0.99924	28	0.99623
16	0.99894	30	0.99565
18	0.99860	32	0.99503
20	0.99820	34	0.99437
22	0.99770	36	0.99369

Interpretación de resultados

Tipos de suelos	g/cm ³
Orgánicos y volcánicos	
- Arcilloso	1.0 – 1.19
- Francosos	1.20 – 1.32
- Arenosos	Mayor a 1.32

Anexo A10. Medio de cultivo Rojo Congo

Reactivo	Cantidad
Ácido málico	5 g
K ₂ HPO ₄	0.5 g
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.2 g
NaCl	0.1 g
FeCl ₃ ·6H ₂ O	0.015 g
KOH	4.8 g
Extracto de levadura	0.5 g
Rojo Congo 1:400	15.0 mL
Agar	15 g
H ₂ O destilada	1 L
pH	7

Döbereiner, 1995; Holguín et al., 1996

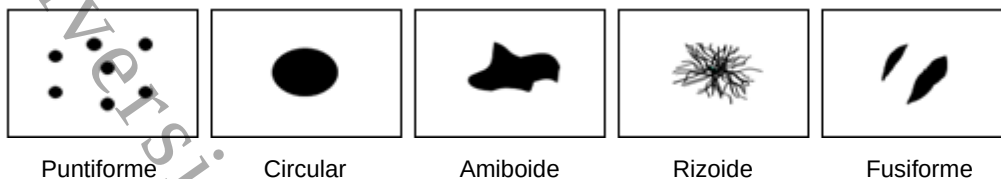
Anexo A11. Medio de cultivo Ashby

Reactivos	Cantidad
Manitol	5 g
K ₂ HPO ₄	5 g
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.2 g
NaCl	0.5 g
CaCO ₃	5.0 g
K ₂ SO ₄	0.1 g
Agar	15 g
H ₂ O destilada	1 L
pH	7

Subba, 1999

Anexo A12. Morfología de las colonias bacterianas.

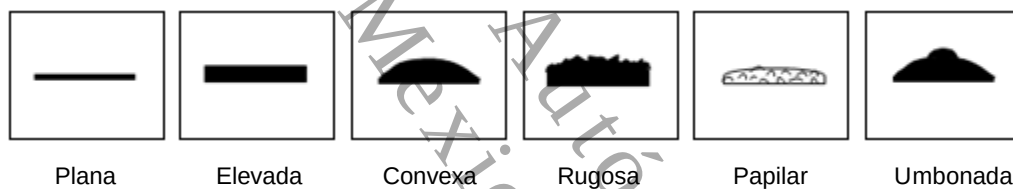
Forma



Bordes



Elevación



(Aquiahuatl *et al.*, 2012).

Anexo A13. Análisis de varianza del pH en tres tiempos (día 1, 30 y 60) después de la incubación, para tratamientos de a) BIO-AZP, b) BIO-AZT. ($p \leq 0.05$).

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	F	P
a)					
Tiempo	2	8.6952	4.3476	58.78	0.000
Error	93	6.8786	0.0740		
Total	95	15.5738			
S = 0.2720, $R^2 = 55.83\%$, $R^2 (aj) = 54.88\%$					
b)					
Tiempo	2	7.552	3.776	18.75	0.000
Error	93	18.729	0.201		
Total	95	26.281			
S = 0.4488, $R^2 = 28.73\%$, $R^2 (aj) = 27.20\%$					

Anexo A14. Análisis de varianza del CO en tres tiempos (día 1, 30 y 60) después de la incubación, para tratamientos de a) BIO-AZP, b) BIO-AZT. ($p \leq 0.05$).

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	F	P
a)					
Tiempo	2	425.4	212.7	9.26	0.000
Error	93	2135.6	23.0		
Total	95	2561.0			
S = 4.792, $R^2 = 16.61\%$, $R^2 (aj) = 14.82\%$					
b)					
Tiempo	2	424.5	212.3	12.68	0.000
Error	93	1557.3	16.7		
Total	95	1981.8			
S = 4.092, $R^2 = 21.42\%$, $R^2 (aj) = 19.73\%$					

Anexo A15. Análisis de varianza del NT en tres tiempos (día 1, 30 y 60) después de la incubación, para tratamientos de a) BIO-AZP, b) BIO-AZT. ($p \leq 0.05$).

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	F	P
a)					
Tiempo	2	21.33	10.66	7.41	0.001
Error	93	133.92	1.44		
Total	95	155.25			
S = 1.200, $R^2 = 13.74\%$, $R^2 (aj) = 11.88\%$					
b)					
Tiempo	2	15.14	7.57	5.88	0.004
Error	93	119.69	1.29		
Total	95	134.83			
S = 1.134, $R^2 = 11.23\%$, $R^2 (aj) = 9.32\%$					

Anexo A16. Análisis de varianza de las UFC en tres tiempos (día 1, 30 y 60) después de la incubación, para tratamientos de a) BIO-AZP, b) BIO-AZT. ($p \leq 0.05$).

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	F	P
a)					
Tiempo	2	1.02449E+15	5.12247E+14	41.08	0.000
Error	93	1.15954E+15	1.24681E+13		
Total	95	2.18403E+15			
S = 3531026, $R^2 = 46.91\%$, $R^2 (aj) = 45.77\%$					
b)					
Tiempo	2	4.48426E+14	2.24213E+14	88.78	0.000
Error	93	2.34864E+14	2.52542E+12		
Total	95	6.83290E+14			
S = 1589156, $R^2 = 65.63\%$, $R^2 (aj) = 64.89\%$					

Anexo A17. Efecto de los factores fuente de nitrógeno (FN), fuente de carbono FC y factor suelo (FS), sobre el pH de tratamientos de a) BIO-AZP, b) BIO-AZT, a 30 días de incubación.

Fuente	Efecto	Coefficiente	SE Coef	T	P
a)					
Constante		6.3375	0.01943	326.19	0.000
FN	0.2162	0.1081	0.01943	5.57	0.000
FC	-0.3325	-0.1662	0.01943	-8.56	0.000
FS	-0.3537	-0.1769	0.01943	-9.10	0.000
FN*FC	-0.0188	-0.0094	0.01943	-0.48	0.634
FN*FS	-0.1275	-0.0638	0.01943	-3.28	0.003
FC*FS	0.1638	0.0819	0.01943	4.21	0.000
FN*FC*FS	-0.0025	-0.0012	0.01943	-0.06	0.949
S = 0.109905, R ² = 89.99%, R ² (aj) = 87.07%					
b)					
Constante		6.2978	0.01661	379.17	0.000
FN	0.4406	0.2203	0.01661	13.26	0.000
FC	-0.4531	-0.2266	0.01661	-13.64	0.000
FS	-0.1381	-0.0691	0.01661	-4.16	0.000
FN*FC	-0.2431	-0.1216	0.01661	-7.32	0.000
FN*FS	-0.1331	-0.0666	0.01661	-4.01	0.001
FC*FS	0.0331	0.0166	0.01661	1	0.329
FN*FC*FS	-0.0419	-0.0209	0.01661	-1.26	0.22
S = 0.0939581, R ² = 94.95%, R ² (aj) = 93.48%					

Anexo A18. Efecto de los factores fuente de nitrógeno (FN), fuente de carbono FC y factor suelo (FS), sobre el CO de tratamientos de a) BIO-AZP, b) BIO-AZT, a 30 días de incubación.

Fuente	Efecto	Coefficiente	SE Coef	T	P
a)					
Constante		44.413	0.5418	81.97	0.000
FN	1.341	0.671	0.5418	1.24	0.228
FC	3.762	1.881	0.5418	3.47	0.002
FS	-6.105	-3.052	0.5418	-5.63	0.000
FN*FC	-1.195	-0.597	0.5418	-1.10	0.281
FN*FS	-1.753	-0.876	0.5418	-1.62	0.119
FC*FS	1.969	0.984	0.5418	1.82	0.082
FN*FC*FS	-1.226	-0.613	0.5418	-1.13	0.269
S = 3.06514, R ² = 69.13%, R ² (aj) = 60.12%					
b)					
Constante		45.707	0.4274	106.93	0.000
FN	0.961	0.48	0.4274	1.12	0.272
FC	3.544	1.772	0.4274	4.15	0.000
FS	-5.789	-2.895	0.4274	-6.77	0.000
FN*FC	-0.349	-0.175	0.4274	-0.41	0.686
FN*FS	-0.603	-0.302	0.4274	-0.71	0.487
FC*FS	1.308	0.654	0.4274	1.53	0.139
FN*FC*FS	0.024	0.012	0.4274	0.03	0.977
S = 2.41802, R ² = 73.72%, R ² (aj) = 66.05%					

Anexo A19. Efecto de los factores fuente de nitrógeno (FN), fuente de carbono FC y factor suelo (FS), sobre el N_T de tratamientos de a) BIO-AZP, b) BIO-AZT, a 30 días de incubación.

Fuente	Efecto	Coef	SE Coef	T	P
a)					
Constante		4.1494	0.03628	114.37	0.000
FN	2.0212	1.0106	0.03628	27.86	0.000
FC	-0.5625	-0.2813	0.03628	-7.75	0.000
FS	0.0487	0.0244	0.03628	0.67	0.508
FN*FC	0.3525	0.1762	0.03628	4.86	0.000
FN*FS	0.8463	0.4231	0.03628	11.66	0.000
FC*FS	0.0150	0.0075	0.03628	0.21	0.838
FN*FC*FS	0.0500	0.0250	0.03628	0.69	0.497
S = 0.205239, $R^2 = 97.65\%$, R^2 (aj) = 96.96%					
b)					
Constante		4.1131	0.09773	42.09	0.000
FN	1.8937	0.9469	0.09773	9.69	0.000
FC	-0.4225	-0.2112	0.09773	-2.16	0.041
FS	-0.4225	-0.0463	0.09773	-0.47	0.640
FN*FC	0.0375	0.0188	0.09773	0.19	0.849
FN*FS	0.9875	0.4938	0.09773	5.05	0.000
FC*FS	-0.1938	-0.0969	0.09773	-0.99	0.331
FN*FC*FS	0.2987	0.1494	0.09773	1.53	0.139
S = 0.552843, $R^2 = 84.17\%$, R^2 (aj) = 79.56%					

Anexo A20. Efecto de los factores fuente de nitrógeno (FN), fuente de carbono FC y factor suelo (FS), sobre las UFC de tratamientos de a) BIO-AZP, b) BIO-AZT, a 30 días de incubación.

Fuente	Efecto	Coef	SE Coef	T	P
a)					
Constante		7658333	603326	12.69	0.000
FN	4316667	2158333	603326	3.58	0.002
FC	-2566667	-1283333	603326	-2.13	0.044
FS	-5416667	-2708333	603326	-4.49	0.000
FN*FC	166667	83333	603326	0.14	0.891
FN*FS	-6283333	-3141667	603326	-5.21	0.000
FC*FS	1500000	750000	603326	1.24	0.226
FN*FC*FS	3433333	1716667	603326	2.85	0.009
S = 3412925, $R^2 = 75.57\%$, R^2 (aj) = 68.45%					
b)					
Constante		5204167	358442	14.52	0.000
FN	-1541667	-770833	358442	-2.15	0.042
FC	591667	295833	358442	0.83	0.417
FS	-2875000	-1437500	358442	-4.01	0.001
FN*FC	-2058333	-1029167	358442	-2.87	0.008
FN*FS	441667	220833	358442	0.62	0.544
FC*FS	-358333	-179167	358442	-0.50	0.622
FN*FC*FS	191667	95833	358442	0.27	0.791
S = 2027656, $R^2 = 55.83\%$, R^2 (aj) = 42.95%					

Anexo A21. Análisis de varianza de la altura inicial de plántulas de *E. grandis*.

Fuentes de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	F Calculada	Pr>F
Modelo	5	4.57552083	0.91510417	1.42	0.2635
Error	18	11.57657500	0.64314306		
Total	23	16.15209583			
$R^2=0.283277$, $CV=7.047376$					

Anexo A22. Análisis de varianza de la altura de plántulas de *E. grandis* sembradas en invernadero con seis tratamientos de fertilización.

Fuente	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	F	P
T1-BIO1					
Regresión	1	5132.7	5132.7	281.46	0.000
Error Residual	26	474.1	18.2		
Total	27	5606.9			
$S = 4.27037$, $R^2 = 91.5\%$, $R^2(aj) = 91.2\%$					
T2-BIO2					
Regresión	1	7748.9	7748.9	181.00	0.000
Error Residual	26	1113.1	42.8		
Total	27	8862			
$S = 6.54315$, $R^2 = 87.4\%$, $R^2(aj) = 87.0\%$					
T3-BIO3					
Regresión	1	9409.9	9409.9	318.45	0.000
Error Residual	26	768.3	29.5		
Total	27	10178.2			
$S = 5.43592$, $R^2 = 92.5\%$, $R^2(aj) = 92.2\%$					
T4-BIO4					
Regresión	1	12373	12373	449.31	0.000
Error Residual	26	716.0	28.0		
Total	27	13089			
$S = 5.24766$, $R^2 = 94.5\%$, $R^2(aj) = 94.3\%$					
T5-FQ					
Regresión	1	7085.0	7085.0	665.93	0.000
Error Residual	26	276.6	10.6		
Total	27	7361.7			
$S = 3.26180$, $R^2 = 96.2\%$, $R^2(aj) = 96.1\%$					
T6-T					
Regresión	1	3336.5	3336.5	257.42	0.000
Error Residual	26	337.0	13.0		
Total	27	3673.5			
$S = 3.60018$, $R^2 = 90.8\%$, $R^2(aj) = 90.5\%$					

Anexo A23. Análisis de varianza del diámetro de tallos de plántulas de *E. grandis* sembradas en invernadero con seis tratamientos de fertilización.

Fuente	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	F	P
T1-BIO1					
Regresión	1	53.627	53.627	149.93	0.000
Error Residual	26	9.300	0.358		
Total	27	62.927			
S = 0.598059, R ² = 85.2%, R ² (aj) = 84.7%					
T2-BIO2					
Regresión	1	69.300	69.300	219.54	0.000
Error Residual	26	8.207	0.316		
Total	27	77.507			
S = 0.561833, R ² = 89.4%, R ² (aj) = 89.0%					
T3-BIO3					
Regresión	1	102.22	102.22	285.59	0.000
Error Residual	26	9.31	0.36		
Total	27	111.53			
S = 0.598281, R ² = 91.7%, R ² (aj) = 91.3%					
T4-BIO4					
Regresión	1	144.35	144.35	253.88	0.000
Error Residual	26	14.78	0.57		
Total	27	159.13			
S = 0.754036, R ² = 90.7%, R ² (aj) = 90.4%					
T5-FQ					
Regresión	1	48.497	48.497	442.29	0.000
Error Residual	26	2.851	0.110		
Total	27	51.348			
S = 0.331134, R ² = 94.4%, R ² (aj) = 94.2%					
T6-T					
1	1	24.236	24.236	309.82	0.000
Error Residual	26	2.034	0.078		
Total	27	26.270			
S = 0.279687, R ² = 92.3%, R ² (aj) = 92.0%					

Anexo A24. Análisis de varianza del número de hojas de plántulas de *E. grandis* sembradas en invernadero con seis tratamientos de fertilización.

Fuente	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	F	P
T1-BIO1					
Regresión	1	104188	104188	152.40	0.000
Error Residual	26	17775	684		
Total	27	121963			
S = 26.1465, R ² = 85.4%, R ² (aj) = 84.9%					
T2-BIO2					
Regresión	1	110126	110126	142.03	0.000
Error Residual	26	20159	775		
Total	27	130285			
S = 27.8451, R ² = 84.5%, R ² (adj) = 83.9%					
T3-BIO3					
Regresión	1	256227	256227	109.54	0.000
Error Residual	26	60816	2339		
Total	27	317043			
S = 48.3639, R ² = 80.8%, R ² (aj) = 80.1%					
T4-BIO4					
Regresión	1	328431	328431	174.16	0.000
Error Residual	26	49031	1886		
Total	27	377462			
S = 43.4259, R ² = 87.0%, R ² (aj) = 86.5%					
T5-FQ					
Regresión	1	88538	88538	367.00	0.000
Error Residual	26	6272	241		
Total	27	94810			
S = 15.5320, R ² = 93.4%, R ² (aj) = 93.1%					
T6-T					
1	1	26414	26414	134.33	0.000
Error Residual	26	5112	197		
Total	27	31527			
S = 14.0225, R ² = 83.8%, R ² (aj) = 83.2%					

Anexo A25. Análisis de varianza de la biomasa fresca de plántulas de *E. grandis* a 105 días de sembradas en invernadero con seis tratamientos de fertilización.

Fuentes de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	F Calculada	Pr>F
Biomasa Radical					
Modelo	5	506.0216333	101.2043267	7.43	0.0006
Error	18	245.3425500	13.6301417		
Total	23	751.3641833			
R ² =0.673471, CV=35.99807					
Biomasa Aérea					
Modelo	5	16805.29679	3361.05936	15.39	<0.0001
Error	18	3930.93778	218.38543		
Total	23	20736.23456			
R ² =0.810431, CV=25.93803					
Biomasa Fresca Total					
Modelo	5	23059.20567	4611.84113	14.06	<0.0001
Error	18	5904.17463	328.00970		
Total	23	28963.38030			
R ² =0.796150, CV=26.93909					

Anexo A26. Análisis de varianza de la biomasa seca de plántulas de *E. grandis* a 105 días de sembradas en invernadero con seis tratamientos de fertilización.

Fuentes de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	F Calculada	Pr>F
Biomasa Radical					
Modelo	5	151.2151833	30.2430367	7.27	0.0007
Error	18	74.9149500	4.1619417		
Total	23	226.1301333			
R²=0.668709, CV=34.92297					
Biomasa Aérea					
Modelo	5	3393.729371	678.745874	14.57	<0.0001
Error	18	838.749025	46.597168		
Total	23	4232.478396			
R²=0.801830, CV=19.07407					
Biomasa Seca Total					
Modelo	5	4975.850121	995.170024	13.47	<0.0001
Error	18	1329.383375	73.854632		
Total	23	6305.233496			
R²=0.789162, CV=20.64367					

Anexo A27. Análisis de varianza del nitrógeno total en suelo con plántulas de *E. grandis* a 15, 60 y 105 días de ser sembradas en invernadero.

Fuentes de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	F Calculada	Pr>F
15 días					
Modelo	5	0.08393333	0.01678667	79.52	<0.0001
Error	18	0.00380000	0.00021111		
Total	23	0.08773333			
R ² =0.956687, CV=5.251685					
60 días					
Modelo	5	0.18347083	0.03669417	53.16	<0.0001
Error	18	0.01242500	0.00069028		
Total	23	0.19589583			
R ² =0.936573, CV=9.837056					
105 días					
Modelo	5	0.31633750	0.06326750	591.59	<0.0001
Error	18	0.00192500	0.00010694		
Total	23	0.31826250			
R ² =0.993952, CV=4.331474					

Anexo A28. Análisis de varianza del fósforo disponible en suelo con plántulas de *E. grandis* a 15, 60 y 105 días de ser sembradas en invernadero.

Fuentes de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	F Calculada	Pr>F
15 días					
Modelo	5	48.22923333	9.64584667	191.06	<0.0001
Error	18	0.90875000	0.05048611		
Total	23	49.13798333			
R ² =0.981506, CV=1.573927					
60 días					
Modelo	5	451.0743500	90.2148700	516.97	<0.0001
Error	18	3.1411000	0.1745056		
Total	23	454.2154500			
R ² =0.993085, CV=2.097871					
105 días					
Modelo	5	379.7329208	75.9465842	1889.28	<0.0001
Error	18	0.7235750	0.0401986		
Total	23	380.4564958			
R ² =0.998098, CV=1.051345					

Anexo A29. Análisis de varianza de la materia orgánica en suelo con plántulas de *E. grandis* a 15, 60 y 105 días de ser sembradas en invernadero.

Fuentes de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	F Calculada	Pr>F
15 días					
Modelo	5	1267.483783	253.496757	725.40	<0.0001
Error	12	4.193467	0.349456		
Total	17	1271.677250			
R ² =0.996702, CV=3.916182					
60 días					
Modelo	5	712.1139611	142.4227922	1069.82	<0.0001
Error	12	1.5975333	0.1331278		
Total	17	713.7114944			
R ² =0.997762, CV=2.841765					
105 días					
Modelo	5	472.9409333	94.5881867	711.78	<0.0001
Error	12	1.5946667	0.1328889		
Total	17	474.5356000			
R ² =0.996640, CV=3.154364					

Anexo A30. Análisis de varianza del pH en suelo con plántulas de *E. grandis* a 15, 60 y 105 días de ser sembradas en invernadero.

Fuentes de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	F Calculada	Pr>F
15 días					
Modelo	5	4.19111111	0.83822222	215.54	<0.0001
Error	12	0.04666667	0.00388889		
Total	17	4.23777778			
R ² =0.988988, CV=0.943275					
60 días					
Modelo	5	2.03611111	0.40722222	183.25	<0.0001
Error	12	0.02666667	0.00222222		
Total	17	2.06277778			
R ² =0.987072, CV=0.741073					
105 días					
Modelo	5	2.43111111	0.48622222	437.60	<0.0001
Error	12	0.01333333	0.00111111		
Total	17	2.44444444			
R ² =0.994545, CV=0.532860					