



FACULTAD DE INGENIERÍA Y CIENCIAS AGROPECUARIAS

EVALUACIÓN DE LA FIJACIÓN DE NITRÓGENO Y SU INFLUENCIA EN
EL CRECIMIENTO FOLIAR Y RADICULAR DE *Rosa* spp. MEDIANTE LA
INTERACCIÓN DE LA BACTERIA NITRIFICANTE *Azospirillum* spp.



AUTOR

Freddy Humberto Marin Dett

AÑO

2017



FACULTAD DE INGENIERÍA Y CIENCIAS AGROPECUARIAS

EVALUACIÓN DE LA FIJACIÓN DE NITRÓGENO Y SU INFLUENCIA EN EL
CRECIMIENTO FOLIAR Y RADICULAR DE *Rosa* spp. MEDIANTE LA
INTERACCIÓN DE LA BACTERIA NITRIFICANTE *Azospirillum* spp.

Trabajo de Titulación presentado en conformidad con los requisitos establecidos
para optar por el título de Ingeniero en Biotecnología

Docente Guía

M.Sc. Wilson David Tapia López

Autor

Freddy Humberto Marin Dett

Año

2017

DECLARACIÓN DEL DOCENTE GUÍA

“Declaro haber dirigido este trabajo a través de reuniones periódicas con la estudiante, orientando sus conocimientos y competencias para un eficiente desarrollo del tema escogido y dando cumplimiento a todas las disposiciones vigentes que regulan los Trabajos de Titulación”.

Wilson David Tapia López

Máster Universitario en Gestión y Planificación Ambiental

C.I: 171420528-1

DECLARACIÓN DEL DOCENTE CORRECTOR

“Declaro haber dirigido este trabajo a través de reuniones periódicas con la estudiante, orientando sus conocimientos y competencias para un eficiente desarrollo del tema escogido y dando cumplimiento a todas las disposiciones vigentes que regulan los Trabajos de Titulación”.

Fernando Xavier Rivas Romero

Máster universitario en Biotecnología Molecular y Celular de plantas

C.I: 171809270-1

DECLARACIÓN DEL DIRECTOR CIENTÍFICO

“Declaro haber dirigido este trabajo a través de reuniones periódicas con la estudiante, orientando sus conocimientos y competencias para un eficiente desarrollo del tema escogido y dando cumplimiento a todas las disposiciones vigentes que regulan los Trabajos de Titulación”.

Antonio León-Reyes

Doctor en Interacciones planta-patógeno

Universidad San Francisco de Quito

C.I: 171251924-6

DECLARACIÓN DE AUTORÍA DEL ESTUDIANTE

“Declaro que este trabajo es original, de mi autoría, que se han citado las fuentes correspondientes y que en su ejecución se respetaron las disposiciones legales que protegen los derechos de autor vigentes”.

Freddy Humberto Marin Dett
C.I. 171443870-0

AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer a mis amigos por darme su amistad y apoyo incondicional que me permitió crecer no solo como profesional sino como persona. Quisiera agradecer también a mis profesores; especialmente a Santiago Zárate, a Emilia Vázquez y a Vivian Morera por la formación profesional que me brindaron, por su amistad y sus consejos que me permitieron crecer personalmente. Al M.Sc. Wilson Tapia, quien fue el responsable de guiarme durante el desarrollo de este trabajo, al M.Sc. Fernando Rivas, por sus consejos, acompañamiento y su amistad durante mi carrera y mi trabajo de titulación. Finalmente, al Dr. Antonio León Reyes quien me brindó la oportunidad de realizar este hermoso proyecto, y quien, con su guía y amistad me permitió dar lo mejor de mí.

DEDICATORIA

Dedico este trabajo especialmente a mis padres, Fredy e Yrma, por sus consejos y criterios, que me ayudaron a formar mi carácter y a su apoyo incondicional gracias al cual conseguí convertirme en profesional. A mis hermanos menores, André e Isabel, quienes cada día me recuerdan que siempre existen motivos para ser feliz y sin quienes simplemente no podría serlo. A mi abuelo Néstor quien me ha acompañado en este proceso, quien desde pequeño me sacó una sonrisa y quien fue como un segundo padre para mí. Al resto de mi familia que supieron valorar mi esfuerzo y dedicación. Finalmente, a la memoria de mi Mamá Rosa y mi Mamá Elda, quienes siempre estuvieron y estarán a mi lado, que con su amor, cariño y dedicación me ayudaron a ser quien soy y por quienes siempre buscaré ser mejor.

RESUMEN

La bacteria nitrificante *Azospirillum* spp. ha sido muy estudiada debido a varias características que la clasifican como una rizobacteria promotora del crecimiento vegetal (PGPR), entre las cuales la más importante es la de fijación de nitrógeno, mediante la reducción de nitrógeno ambiental a nitrato y amonio. Mediante este estudio se plantea utilizar la bacteria para mejorar el desarrollo inicial de patrones de rosa, debido a la importancia que tiene este cultivo en Ecuador. Para ello se establecieron 4 concentraciones de la bacteria: 10^1 , 10^6 , 10^9 y 10^{12} UFC, y se las comparó con un control el cual consistió en fertilización química y un control sin nitrógeno. El estudio tuvo 5 repeticiones de cada tratamiento y 3 réplicas biológicas. La inoculación de cada tratamiento de *Azospirillum* spp. se realizó con una cepa comercial, mediante aplicación semanal al cultivo, tomando la fertilización química como control y bajo condiciones de invernadero. Al final del experimento se observó que el tratamiento E (10^{12} CFU), en las variables peso seco de raíz y de parte aérea del patrón; (1.39 g y de 8.23 g, respectivamente) y en el diferencial del tamaño radicular y de la parte aérea del patrón, (3.87 cm y de 18.42 cm, respectivamente) fueron los mayores registros que se generaron, los cuales se ajustan a la tendencia expuesta en varios estudios. En las variables amonio y nitrato en el suelo, el tratamiento D dio lugar a la mayor concentración (374 y 11.62 ppm, respectivamente), lo cual es relevante pues se obtuvo una mayor concentración en comparación a estudios ya realizados. En el análisis del N foliar, el tratamiento D obtuvo el mayor registro (3.19%), con lo cual podemos corroborar lo citado en la bibliografía; que la bacteria tienen una actividad fijadora de nitrógeno y que además ayuda a una mejor absorción de nutrientes, por lo que, los tratamientos con la bacteria generaron los mejores resultados en las variables estudiadas en la presente investigación.

ABSTRACT

The nitrifying bacterium *Azospirillum* spp. has been well studied due to several characteristics that classify it as a plant growth promoting rhizobacteria (PGPR), among which the most important is nitrogen fixation, through the reduction of environmental nitrogen to nitrate and ammonium. This study proposes to use the bacterium to improve the initial development of rose patterns, due to the importance of this crop in Ecuador. For this, 4 concentrations of the bacterium were established: 10^1 , 10^6 , 10^9 and 10^{12} CFU, and were compared with a control which consisted of chemical fertilization and a control without nitrogen. The study had 5 replicates of each treatment and 3 biological replicates. The inoculation of *Azospirillum* spp. was carried out with a commercial strain, by weekly application to the crop, taking the chemical fertilization as control and under greenhouse conditions. At the end of the experiment it was observed that the E treatment (10^{12} UFC), in the variables dry weight of root and aerial part of the pattern; (1.39 g and 8.23 g, respectively), and in the differential of the root size and the aerial part of the pattern, (3.87 cm and 18.42 cm, respectively) were the largest records that were generated, which conform to the exposed trend in several studies. In the variables ammonium and nitrate in the soil, treatment D resulted in the highest concentration (374 and 11.62 ppm, respectively), which is relevant because a higher concentration was obtained in comparison to studies already performed. In the analysis of foliar N, treatment D obtained the highest registry (3.19%), with which we can corroborate the cited in the bibliography; that the bacteria have a nitrogen fixing activity and that also helps a better absorption of nutrients, so that the treatments with the bacteria generated the best results in the variables studied in the present investigation.

ÍNDICE

1. Capítulo I. Introducción	1
1.1. Antecedentes.....	1
1.2. Planteamiento del Problema	3
1.3. Objetivo general	5
1.4. Objetivos específicos.....	5
1.5. Justificación de la Investigación	6
2. Capítulo II. Marco Teórico	7
2.1. Importancia económica de las Rosas en el Ecuador.....	7
2.2. Impacto Ambiental del cultivo de Rosas.....	10
2.3. <i>Azospirillum</i> spp.	12
2.4. Casos de aplicación de <i>Azospirillum</i> spp.	20
3. Capítulo III. Diseño del plan experimental	22
4. Capítulo IV. Procedimientos.....	25
4.1. Población y Muestra	25
4.2. Materiales y Métodos para la obtención de datos.	26
4.2.1 Reconstitución de la cepa.	26
4.2.2 Manejo de los bioensayos.	26
4.2.2.1 Aclimatación de los bioensayos.....	26
4.2.2.2 Aplicaciones de los tratamientos.	27
4.2.3 Determinación de parámetros.	28
4.2.3.1 Medición de tamaño aéreo y radicular del patrón.....	28
4.2.3.2 Medición del peso seco de la parte aérea y radicular del patrón..	29
4.2.4 Determinación de las formas de nitrógeno del suelo.....	29
4.2.5 Determinación del nitrógeno foliar.....	31
4.2.6 Evaluación estadística de los resultados.....	31
5. Capítulo V. Resultados y Discusión	32
6. Conclusiones y Recomendaciones	48

6.1. Conclusiones	48
6.2. Recomendaciones	49
Referencias	50
ANEXOS	57

1. Capítulo I. Introducción

1.1. Antecedentes

La rizósfera mantiene la proliferación y la actividad de muchas bacterias de distintos tipos, entre las cuales se encuentran varias que ayudan al crecimiento vegetal, que se las conoce como rizobacterias promotoras del crecimiento (PGPR de sus siglas en inglés *Plant Growth-Promoting Rhizobacteria*) (Vacheron, et al., 2013). Las PGPR colonizan las raíces de las plantas mono y dicotiledóneas favoreciendo el crecimiento, directamente por medio de un mayor nivel de absorción de nutrientes y el incremento de las tasas de germinación, así mismo como indirectamente debido a que inhiben el desarrollo de organismos patógenos. Morfológicamente en la planta, este grupo de bacterias modifica el sistema radicular, específicamente en las ramificaciones permitiendo de esta forma un mayor desarrollo de raíces secundarias. (Vacheron, et al., 2013). Las PGPR también son usadas en los cultivos porque permiten una mejor respuesta de resistencia sistémica inducida (ISR de sus siglas en inglés *Induced Systemic Resistance*), ya que se observó que las plantas con PGPR respondieron de mejor manera al estrés biótico (infección con patógenos) y abiótico (estrés salino) (Beneduzi, Ambrosini & Passaglia, 2012).

Azospirillum spp. es una rizobacteria perteneciente a las PGPR con características nitrificantes, por lo que se considera una especie de interés en el campo agrícola. La bacteria se encuentra en suelos no intervenidos y cerca de las raíces de las plantas autóctonas. Dicha especie fue considerada por mucho tiempo como una subespecie de *Spirillum lipoferum*, sin embargo, estudios posteriores permitieron establecer un nuevo género denominado *Azospirillum*, el cual se puede dividir en dos grupos: el grupo I llamado *Azospirillum brasilense* con un total de 46 cepas; y el grupo II llamado *Azospirillum lipoferum*, el cual tiene un total de 15 cepas. Un hecho relevante que permitió la identificación de este nuevo género fue la morfología vibroide, con un diámetro que alcanzaba

valores de 1 μm cuando en el medio de cultivo se utilizaba sales con peptona y succinato. Una característica de las células que también llamó la atención fue la presencia de un flagelo polar en un medio básico, y la observación de flagelos laterales de longitud pequeña al modificar la temperatura. *Azospirillum brasilense* fue evaluado también frente a condiciones de estrés hídrico, lo que provocó que la bacteria adquiriera una forma de quiste, retomando la forma de vibrio cuando se terminó dicho estrés. De la misma manera se ha demostrado que altas concentraciones de fosfatos reducen la tasa de crecimiento aeróbico de *A. brasilense*. Asimismo, añadir la norepinefrina (hormona que funciona como neurotransmisor) en el medio de cultivo, mejoró la absorción de oxígeno (O) y la concentración de intermedios de la ruta del ácido tricarbóxico (Das & Mishra, 1984).

Como muchas PGPR nitrificantes, la fijación en *Azospirillum* spp. se da mediante la reducción de N ambiental a nitrato y amonio. Los genes del complejo nitrogenasa presentes en todas las bacterias nitrificantes son los encargados de realizarla bajo condiciones específicas.

A diferencia de muchas PGPR, *A. brasilense* no establece una simbiosis con la planta, pues la bacteria es de vida libre en la rizósfera, y la única ventaja que recibe por parte de la planta son los exudados de carbono (C) que los utiliza para su metabolismo, lo que permite una adecuada colonización del suelo y el desarrollo de su vida libre en la rizósfera (Steenhoudt & Vanderleyden, 2000).

La flor ecuatoriana y particularmente la rosa es reconocida a nivel internacional debido a su alta calidad. Esta alta calidad es producto de las condiciones climáticas donde se desarrolla: cultivos sobre los 2000 m.s.n.m en la línea ecuatorial con un número de horas luz constante durante todo el año (ProEcuador, 2016a). Es el segundo cultivo más importante del país y que es una importante fuente de ingresos. Este cultivo ocupa 3100 hectáreas a nivel nacional del cual el 75% se encuentra en la provincia de Pichincha, pero también

tiene presencia en otras provincias de la sierra ecuatoriana como Cotopaxi y Tungurahua (ProEcuador, 2016a).

1.2. Planteamiento del Problema

En Ecuador, una superficie de 1'699,135.54 ha son sometidas a una fertilización química de las cuáles un 48% es del tipo nitrogenada específicamente, convirtiéndose en una de las mayores aplicaciones de elementos químicos en el suelo. La aplicación de N en cultivos de importancia nacional como los de exportación es imprescindible para los agricultores; por ejemplo, en el cultivo de arroz se utiliza una cantidad de 22.2 Kg/TM de arroz producido (Cárdenas Reinoso & Touma Faytong, 2011). En lo que se refiere al cultivo de banano se emplea entre 350 a 600 Kg N/ha/año (Instituto Nacional de Estadística y Censos, 2014). En el campo florícola por el contrario se aplica aproximadamente 180 Kg N/ha/año. Con dichos valores se puede verificar la magnitud de su utilización, tomando en cuenta que, parte de este N no es disponible para la planta es un factor de riesgo que puede generar impacto ambiental, ya que puede provocar el aumento de la salinidad del suelo dificultando a la planta acceder a otro tipo de nutrientes.

Es importante mencionar que en el cultivo de rosas en el Ecuador, el uso de fertilizantes representa un gasto de aproximadamente el 12% de su costo de producción y, si solo se toma en cuenta a los fertilizantes nitrogenados es del 50% de este valor, por lo que se convierte en uno de los rubros que mayor inversión representan (Marin, 2016).

El suelo es un ecosistema complejo el cual está conformado por varias especies de microorganismos y macroinvertebrados. Las poblaciones de estas especies se han visto drásticamente afectadas por el uso de pesticidas y fertilizantes, por el monocultivo y el incremento de la erosión, generando a largo plazo problemas de desertificación debido a la formación de un sustrato inerte o sin vida.

Recientemente la desertificación ha tomado mucho protagonismo y es considerado un problema a nivel mundial.

El monocultivo extensivo de las rosas en el país ha deteriorado el suelo, debido principalmente al uso indiscriminado de fertilizantes que contienen N en forma de nitrato (NO_3^-) o amonio (NH_4^+). Estadísticas recientes indican que en el país se utilizaron aproximadamente 145.5 Kg/ha de fertilizantes basados en nitrógeno, valor que se encuentra entre los más altos del continente por debajo de Chile y Colombia (256.6 Kg/ha y 390.9 Kg/ha, respectivamente), según datos de la FAO (Food and Agriculture Organization of the United Nations, 2015).

Los fertilizantes que aportan N al suelo son empleados frecuentemente para mejorar la producción y el rendimiento del cultivo de rosa, lo que favorece a que su aplicación sea excesiva. Asimismo, al no consumirse todo el N por parte del cultivo, su sobreutilización representa un riesgo adicional para el medio ambiente. El NO_3^- al ser un compuesto soluble en agua, posee mayor facilidad de movimiento en el suelo por infiltración, lo que provoca que el compuesto pueda llegar a capas profundas del suelo y de esta manera convertirse en un agente contaminante de aguas subterráneas (Arias, Pérez & Rueda, 2004). Adicionalmente, estudios indican que el NH_4^+ acidifica el suelo generando problemas en la nutrición de las plantas, debido a que, conforme el pH cambia también se modifica la tasa de absorción de los distintos macro y micronutrientes del suelo (Binkley & Vitousek, 1989). Los efectos críticos del exceso de N a nivel edáfico también incluyen la erosión y empobrecimiento, esto debido a que aumenta la salinidad del suelo, dificultando la migración de nutrientes, lo que desencadena un aumento en el uso de los fertilizantes, creando círculos viciosos nocivos para el medio ambiente (Martínez Gaspar, Ojeda Barrios, Hernández Rodríguez, Martínez Téllez & De La O Quezada, 2011). A largo plazo, esto puede terminar en una desertificación del suelo con la pérdida de la producción y de las tierras cultivables agravando el problema. Dado el carácter volátil de los fertilizantes, también se evidencia problemas de contaminación de aire con

gases de tipo invernadero como NH_3 y nitritos (NO_2), los cuales ya han provocado estragos en el clima y en la salud humana (Isermann, 1994).

También es importante mencionar que otra parte del problema de la contaminación que provoca la fertilización inorgánica es la huella de carbono que deja su síntesis, para la cual se obtuvo valores de emisiones de 1916 $\text{gCO}_2\text{e/Kg}$ fertilizante para la urea y de 2676 $\text{gCO}_2\text{e/Kg}$ fertilizante para el nitrato de amonio (Hierro, Atxaerandio & García, 2015). Pero además también en su uso en campo, en el representa la mayor cantidad de emisiones de óxido de nitrógeno (N_2O), se calcula que al menos el 1% de la fertilización nitrogenada aportada al suelo se pierde en forma de N_2O (Vallejo Garcia, Ábalos Rodríguez, Téllez del Río & Guardia, 2013).

Por lo tanto, el uso de *Azospirillum* spp. en una aplicación al suelo en otro tipo de zona climática se convierte en un estudio de interés para lograr una alternativa amigable con el ambiente evitando así los impactos del N excesivo y que además sea económicamente atractiva.

1.3. Objetivo general

Evaluar la fijación de nitrógeno y su influencia en el crecimiento foliar y radicular de *Rosa* spp. mediante la interacción de la bacteria nitrificante *Azospirillum* spp.

1.4. Objetivos específicos

- Evaluar el crecimiento foliar y radicular de *Rosa* spp. mediante medición de tamaño y peso seco.
- Determinar el contenido de nitrógeno en el suelo y foliar.

1.5. Justificación de la Investigación

Azospirillum spp. ha sido caracterizado por su capacidad de fijación de nitrógeno (N) atmosférico. Se han realizado algunas investigaciones con cereales particularmente con trigo (*Triticum aestivum*) donde se evidenció un incremento del 45% al 68% en la concentración de N comparado con los controles sin bacteria (Kapulnik, Okon & Henis, 1987). No obstante, la mayoría de las investigaciones han usado *A. brasilense* con modificaciones genéticas en los que se ha tratado de potenciar sus efectos benéficos. Estos transformantes (entiéndase a transformantes como Organismos Genéticamente Modificados) fueron realizados tomando en cuenta los estudios sobre los genes relacionados con la actividad nitrificante (*nif*), los cuales son muy conservados entre todas las bacterias nitrificantes y en todas las especies diazotróficas que pertenecen al orden de las proteobacterias.

Mediante la inoculación de *Azospirillum* spp. como bioestimulante debido a su actividad fijadora de N, permitiría disminuir la cantidad de fertilizante mineral utilizado en el campo florícola. Además, que al disminuir la cantidad de fertilizante aplicado a suelo se mejoraría el transporte y absorción de los nutrientes. Asimismo, indirectamente se obtendría un proceso de repoblación de este microorganismo en el suelo, y que, por su capacidad de fijación de N, se convierte en una forma de enriquecimiento natural permitiendo así disminuir la presión ejercida sobre el suelo y los impactos ambientales asociados, como la erosión, potenciando así la relación suelo- planta.

Azospirillum spp. es muy reconocida por las ventajas que proporciona y se la observa como un medio para tratar el problema anteriormente citado. Sin embargo, la mayoría de estudios realizados con la bacteria se lo ha hecho en zonas tropicales y aplicando la bacteria desde la germinación, donde se ha buscado una forma de mejorar el desarrollo, producción y rendimiento de las plantas (especialmente en trigo) (*Triticum aestivum* y *Triticum durum*).

Con la ejecución del presente proyecto, se fomenta la investigación biotecnológica en el país, ya que busca usar la biodiversidad nacional como un punto de desarrollo para nuevos productos de aplicación en el campo agrícola, que reduzcan el uso de productos sintéticos y representen una alternativa económica a los productores florícolas. Por ello, este proyecto se basa en la evaluación de un microorganismo con un potencial uso como biofertilizante; lo cual se enmarca dentro del Plan Nacional del Buen Vivir, el cual busca el desarrollo de industrias que basen su producción e investigación en productos como los biofertilizantes agrícolas (Secretaría Nacional de Planificación, 2013).

Otro de los beneficios que se obtendrían serían los nichos de mercado que se podrían generar para la exportación y venta de rosas. En los últimos años el comercio de ornamentales producidas bajo certificaciones de producción orgánica ha ganado fuerza; de esta manera, el proyecto se convierte en una alternativa para una producción florícola amigable con el ambiente lo que permitiría el acceso a nuevos mercados que prefieren los productos orgánicos.

2. Capítulo II. Marco Teórico

2.1. Importancia económica de las Rosas en el Ecuador

Por muchos años Ecuador ha sido reconocido por la calidad de sus flores y su producción cubre una gran parte de la demanda mundial. En la economía nacional las rosas representan un 5.35% de las exportaciones no petroleras nacionales hasta el 2013 como se puede apreciar en la Tabla 1 (Dirección de Inteligencia Comercial e Inversiones, 2014):

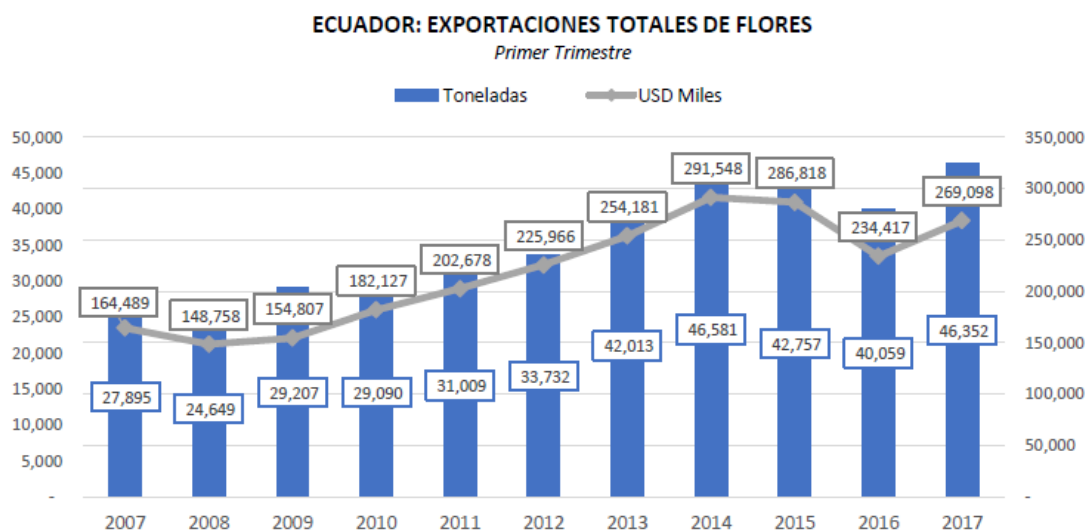
Tabla 1

Principales Productos No Petroleros Exportados Por Ecuador.

Subpartida	Descripción	Unidades	Ene-Dic			Variación		Part. 2012
			2011	2012	2013	2011 - 2012	2012 - 2013	
0803.00.12.00*	BANANAS FRESCAS TIPO «CAVENDISH VALERY»	Fob Miles USD	2,145,597	1,992,464	2,263,727	-7.14%	13.61%	19.98%
		Toneladas	5,391,885	4,981,162	5,307,841	-7.62%	6.56%	60.13%
0306.13.91.00*	LOS DEMÁS CAMARONES CONGELADOS	Fob Miles USD	1,100,493	1,255,571	1,455,367	14.09%	15.91%	12.59%
		Toneladas	174,982	205,377	181,957	17.37%	-11.40%	2.48%
1604.14.10.00	ATUNES EN CONSERVA	Fob Miles USD	557,833	821,168	998,109	47.21%	21.55%	8.23%
		Toneladas	122,577	152,100	171,464	24.09%	12.73%	1.84%
0603.11.00.00	ROSAS FRESCAS CORTADAS	Fob Miles USD	501,747	533,332	610,459	6.30%	14.46%	5.35%
		Toneladas	87,275	87,895	117,484	0.71%	33.66%	1.06%

Adaptada de (ProEcuador, 2016b)

Por tanto, la producción de rosas es un rubro muy importante en la economía ecuatoriana. En relación con el 2014, las exportaciones en el 2015 crecieron en un 2.7% (Figura. 1), a pesar de tener algunas desventajas frente a productores como Colombia y Kenia que son de los más importantes del mundo.



Fuente: BCE
Elaborado por: Expoflores



Figura 1: Exportaciones en toneladas y precios de flores desde el 2010 al 2015 Tomado de (ExpoFlores, 2017).

Estados Unidos es el principal mercado al cual se exportan las rosas ecuatorianas con un 44% de participación, seguido de los países de la Unión Europea. También es importante destacar al mercado ruso como se puede apreciar en la Figura 2 (ProEcuador, 2016b).

Participación del mercado 2015

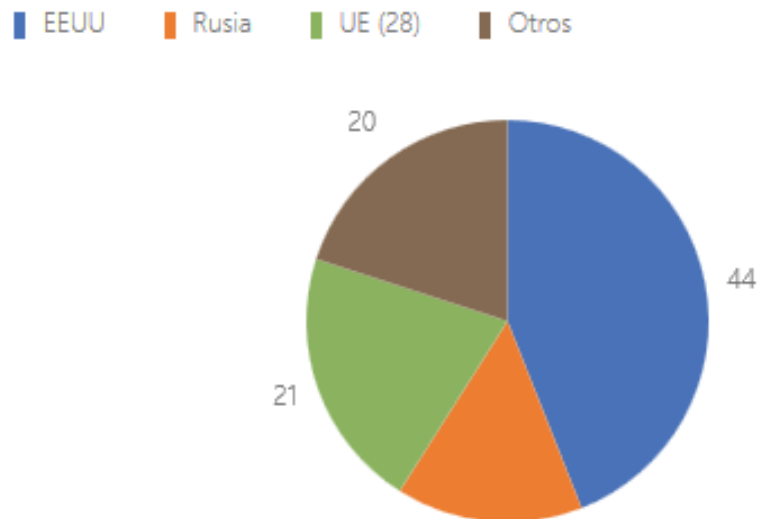


Figura 2: Principales productos y destinos de las rosas ecuatorianas.

Tomado de (ProEcuador, 2016a)

Sudamérica también es un nicho de mercado importante también. A lo largo de los años ha habido varios cambios en el destino de las exportaciones, sin embargo; Chile sigue siendo nuestro principal socio comercial ya que adquiere el 46.7% de las flores ecuatorianas que son destinadas a Sudamérica, lo que se puede apreciar en la Figura 3 (ProEcuador, 2016b).

Ecuador: Participación del mercado sudamericano (2015)

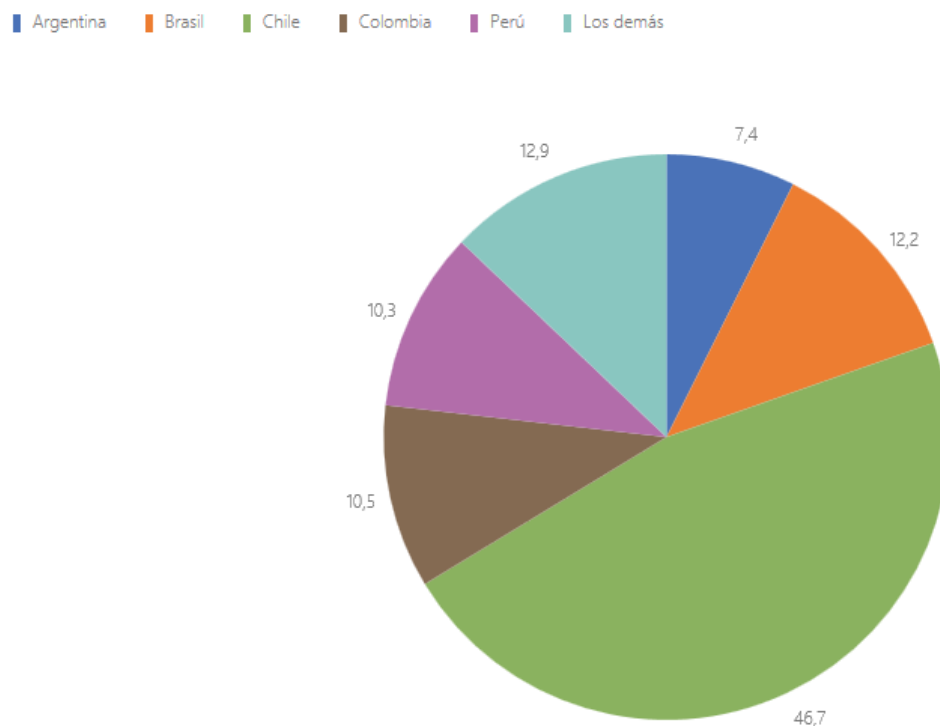


Figura 3: Participación de las rosas ecuatorianas en el mercado sudamericano.

Tomado de (ProEcuador, 2016a)

El sector florícola también es importante por la cantidad de empleos directos e indirectos que genera, según datos de ExpoFlores (2013 para el 2011 el sector generaba 48.000 plazas de trabajo directas (de las cuales el 51% son mujeres) y 55.000 plazas indirectas lo que da un total de 420.000 personas que dependen del sector, estas cifras lo convierte en la mayor fuente de empleos en la Sierra ecuatoriana y también como el mayor generador de empleos y de divisas por cada hectárea productiva (ExpoFlores, 2013).

2.2. Impacto Ambiental del cultivo de Rosas

Actualmente uno de los mayores contaminadores del ambiente es la producción florícola debido al uso excesivo de productos químicos, especialmente de

fertilizantes nitrogenados. La contaminación producida por la utilización de este tipo de compuestos en la producción de flores es evidente, en su mayoría, en el suelo y en el agua (ACCIÓN ECOLÓGICA, 2000).

En lo que se refiere a contaminación acuífera esta se produce por la aplicación de fertilizantes a nivel foliar y en el suelo, donde el excedente que no es aprovechado por la planta es susceptible de lixiviación llegando a contaminar capas freáticas. Al aumentar la concentración de NO_2 o NO_3 en cuerpos de agua, se promueve el crecimiento de algas, y plantas acuáticas que consumen el O_2 , generando impactos en la biota como la mortalidad en peces u otras especies acuáticas, y por lo tanto la pérdida de la biodiversidad (Martínez Gaspar, et al., 2011). Adicionalmente, se reduce la incidencia de radiación, debido a que la luz no sobrepasa la superficie debido al crecimiento de plantas acuáticas, lo que disminuye la capacidad autodepuradora del ecosistema acuático (Martínez Gaspar, et al., 2011).

La contaminación de las fuentes de agua afectan a los pobladores que se encuentra en la zona de los cultivos, debido a que el consumo de agua contaminada con altos niveles de NO_3^- , puede provocar problemas de salud como la metahemoglobinemia (especialmente en lactantes) y el linfoma de no-Hodgkin (Martínez Gaspar, et al., 2011).

El NO_3^- es la forma de N que genera un mayor nivel de contaminación difusa de aguas superficiales y subterráneas, y su control es complejo debido a que hay muchos puntos de entrada del N en el terreno, y la dificultad que supone encontrar el punto por donde ingresa el contaminante. Este fenómeno es importante considerando que el 50% de la contaminación en cuencas hidrográficas corresponde a la difusa (Martínez Gaspar, et al., 2011).

El NO_3^- es altamente soluble en agua, lo que favorece su lixiviación hacia aguas subterráneas. Además, el N se puede acumular en el subsuelo incrementando de esta forma el riesgo de contaminación de aguas subterráneas, cauces y reservorios. La cantidad de NO_3^- que se lixivie depende del régimen de pluviosidad y del tipo de suelo, donde un suelo de textura gruesa permite un mayor movimiento del N. Una gran parte de los suelos contienen partículas coloidales cargadas negativamente, por lo que repelerán a los aniones como el NO_2^- y NO_3^- , acelerando aún más su lixiviación (Martínez Gaspar, et al., 2011).

La contaminación de suelo es algo evidente cuando se refiere a la producción florícola, aunque todavía existe una carencia en cuanto a las investigaciones relacionadas con el tema. Sin embargo, es importante mencionar que el impacto en el suelo se relaciona con la pérdida de la microbiota natural; debido al uso de pesticidas, y su composición orgánica generando empobrecimiento de la calidad del suelo; ya que cada vez hay menos nutrientes disponibles, lo que reduce el nivel su nivel de producción (ACCIÓN ECOLÓGICA, 2000). El agricultor, al notar que el cultivo no tiene el mismo rendimiento, aplica cada vez una cantidad mayor de fertilizantes, incrementando de esta forma el impacto de dicho componente en el ambiente (ACCIÓN ECOLÓGICA, 2000).

2.3. *Azospirillum* spp.

El género *Azospirillum* ha sido conocido durante muchos años por ser parte de las PGPR (del inglés *Plant Growth Promoting Bacteria*). Este género ha sido aislado de la rizósfera de varios tipos de pastos y cereales alrededor del mundo, tanto en climas templados como tropicales. Se ha observado que, tanto en suelos tratados con químicos para sembríos como en suelos vírgenes, estas bacterias han ayudado a un mejor desarrollo y producción de los cultivos. Actualmente se han identificado 5 especies: *Azospirillum lipoferum*, *Azospirillum*

brasiliense, *Azospirillum amazonense*, *Azospirillum halopraeferens* y *Azospirillum irakense* (Steenhoudt & Vanderleyden, 2000).

Este género está formado por bacterias Gram negativas, de vida libre y que son fijadoras de N. Muestran un metabolismo versátil, es decir fácilmente adaptable, de C y N, lo que les permite adaptarse y establecerse en la rizósfera. Entre las fuentes de N más comunes podemos nombrar al amonio (NH_4), NO_3 , NO_2 , aminoácidos y N molecular. En condiciones no favorables, como desecación y limitación de nutrientes, producen endosporas; este cambio morfológico viene acompañado del desarrollo de una membrana externa de polisacáridos, los cuales son su fuente de C y energía en estas condiciones, además de protegerlo de las condiciones adversas del suelo (Steenhoudt & Vanderleyden, 2000).

En las diferentes especies de este género se ha visto un patrón mixto de flagelación; *Azospirillum brasiliense* desarrolla un flagelo polar durante su crecimiento en medio líquido y lo usa para nadar en el medio. También desarrolla flagelos laterales cuando se cultiva en medio sólido, los que generan el anclaje de la bacteria a este tipo de medio. En las especies *Azospirillum amazonense* y *Azospirillum halopraeferens*, en cambio solo se desarrolla el flagelo polar. La motilidad es una ventaja importante en la supervivencia, ya que permite a la bacteria buscar el mejor lugar para establecerse y sobrevivir, una característica observada tanto en su vida en el suelo como en los cultivos en laboratorio. Cuando se ha inoculado la bacteria en el suelo junto con semillas de trigo, se ha visto que la bacteria también busca el sitio más ideal para su crecimiento (Steenhoudt & Vanderleyden, 2000); sin embargo, en este caso el movimiento se ve limitado por la humedad del suelo. Esta motilidad les permite a las bacterias buscar las concentraciones óptimas de O_2 , lo cual es conocido como aerotaxis. Las investigaciones en *A. brasiliense* han demostrado que hay tres genes relacionados con su motilidad: *Mot1* y *Mot2*, los cuales probablemente estén vinculados con la síntesis y el funcionamiento de los flagelos laterales; y *Mot3* el

cual tiene efecto tanto sobre los flagelos laterales como sobre el flagelo polar (Steenhoudt & Vanderleyden, 2000).

Estos genes son de vital importancia, pues se ha observado que la interacción planta – bacteria depende tanto la motilidad como el anclaje de *A. brasilense* a las raíces de ésta. Este anclaje sucede en un proceso bifásico: en una primera fase la bacteria por medio del flagelo y por sí solo, se adsorbe o ancla a las raíces de la planta en forma rápida, débil y reversible; la reversibilidad se produce por tratamientos de temperatura y ácidos. En una segunda fase sucede el proceso de anclaje para el cual son importantes los agregados bacterianos que permiten un anclaje firme e irreversible a las raíces (Figura 4) (Steenhoudt & Vanderleyden, 2000).

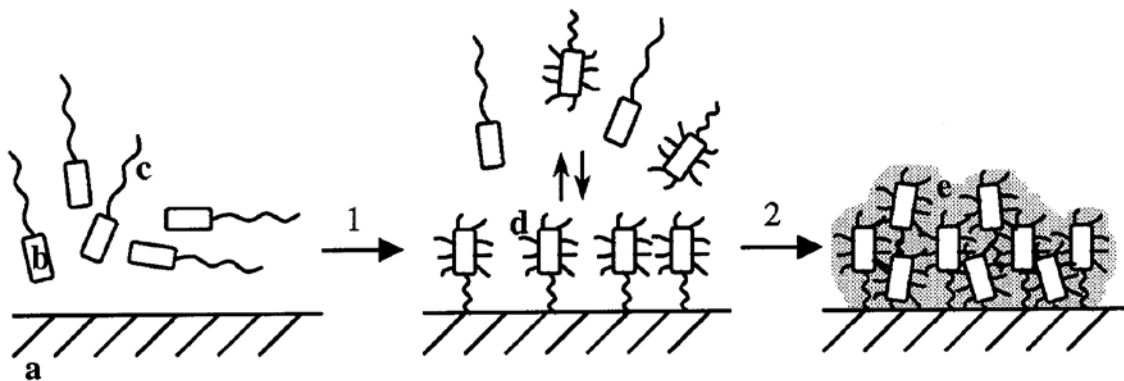


Figura 4: Proceso de anclaje bifásico de *Azospirillum brasilense* a la superficie radicular de la planta.

Tomado de (Steenhoudt & Vanderleyden, 2000).

a) Fase 1 representa una débil, reversible adsorción mediada por la flagelina del flagelo polar. Fase 2 representa el anclaje firme e irreversible, en el cual los polisacáridos extracelulares tienen un papel importante.

b) Las letras son usadas para referirse a la superficie radicular de la planta (a), células de *A. brasilense* (b), el flagelo polar (c), flagelos laterales (d) y los polisacáridos extracelulares (e). el papel de los flagelos laterales en el proceso no está claro aún.

Si bien el proceso de anclaje de la bacteria en la planta ha sido ampliamente estudiado, los mecanismos mediante los cuales interactúan con las raíces de la planta aún no son del todo claros. Por ejemplo, se sabe que el trigo produce WGA (WGA de las siglas en inglés *Wheat Germ Agglutinin*) a la cual se la considera como la señal de la asociación de la planta con la bacteria. La unión de la WGA con la bacteria induce cambios en el metabolismo celular de *Azospirillum* spp., promoviendo la fijación de N atmosférico (N_2), excreción de iones NH_4 y biosíntesis de IAA. Se ha reportado la presencia de lectinas en la pared de *Azospirillum* spp., la cual puede estar relacionada al reconocimiento y colonización de las superficies radiculares (Steenhoudt & Vanderleyden, 2000).

La característica más apreciada de *Azospirillum* spp. es su actividad fijadora de N, la cual se da por la conversión de N_2 a NH_3^+ , bajo condiciones de microaerobiosis y bajos niveles de N. esto gracias a la acción del complejo de la nitrogenasa, complejo que está formada por dos componentes: la proteína dinitrogenasa (proteína MoFe, NifDK), que contiene un co-factor de hierro-molibdeno, donde se realiza la reducción de N_2 ; y la proteína reductasa dinitrogenasa (proteína Fe, NifH) que transfiere los electrones de un donador al complejo de la proteína dinitrogenasa. El operón *nifHDK*, que codifica ambos componentes de la nitrogenasa, fue aislado gracias a su similaridad con el operón *nifHDK* de *Klebsiella pneumoniae*. Varios genes *nif* y *fix* involucrados en el procesamiento y el transporte de electrones, biosíntesis del co-factor MoFe, así como los de regulación de la fijación de N han sido aislados (Steenhoudt & Vanderleyden, 2000). A excepción de los genes *NifA* y *nifB* que son transcritos separadamente, todos residen en un *cluster* de los genes *nif* de 30 Kb, en los cuales están incluidos los genes *nifHDK*, que son los genes que están involucrados en la fijación de N_2 (Tabla 2) (Steenhoudt & Vanderleyden, 2000).

Tabla 2

Genes de Azospirillum involucrados en la fijación, asimilación y regulación de N.

Gen	Función
<i>nifH</i>	Gen estructural de la dinitrogenasa reductasa (Proteína Fe)
<i>nifD</i>	Gen estructural de la dinitrogenasa (Proteína MoFe, subunidad α)
<i>nifK</i>	Gen estructural de la dinitrogenasa (Proteína MoFe, subunidad β)
<i>nifA</i>	Activador transcripcional de los genes de fijación de Nitrógeno (<i>nif</i>)
<i>gltDB</i>	Genes estructurales de la glutamato sintasa
<i>glnA</i>	Gen estructural de la glutamina sintetasa
<i>amtB</i>	Gen estructural del transportador de Amonio
<i>glnB</i>	Proteína transmisora de la señal de Nitrógeno (P _{II})
<i>glnZ</i>	Homólogo de la P _{II}
<i>glnD</i>	Uridililtransferasa/ Enzima removedora del Uridilil (UTasa/UR)
<i>ntrB</i>	Proteína sensor del sistema regulador de dos componentes involucrado en el control general del Nitrógeno
<i>ntrC</i>	Proteína reguladora del sistema regulador de dos componentes involucrado en el control general del Nitrógeno
<i>ntrA, rpoN</i>	Factor sigma alternativo, σ^{54}
<i>draT</i>	Dinitrogenasa reductasa ADP ribosil-transferasa
<i>draG</i>	Dinitrogenasa reductasa activadora de la glicohidrolasa

Adaptada de Steenhoudt y Vanderleyden (2000).

En condiciones de microaerobiosis, consumen mucha energía la cual está regulado por el transporte de electrones que se produce debido a los genes *fix*, dentro de los cuales se encuentran los *clusters* de los genes *fixLJ* y *fixK*. El transcrito *FixLJ* tiene dos componentes: la proteína *FixL* que, en ausencia de O₂, se autofosforila y transfiere el grupo fosfato a *FixJ*; y el *FixJ* fosforilado que activa

la expresión de *FixK*, el cual activa la transcripción de los genes necesarios para el crecimiento microaeróbico. Otro grupo de genes importantes son el grupo *hup* y el grupo *hyp*, los cuales contienen genes que dan lugar a los sistemas de las hidrogenasas, los cuales son responsables de la oxidación molecular del hidrógeno, proceso que permite recuperar parte de la energía utilizada durante la actividad de la nitrogenasa. Todos estos genes se pueden observar en la Figura 5 (Sant'Anna, et al., 2011).

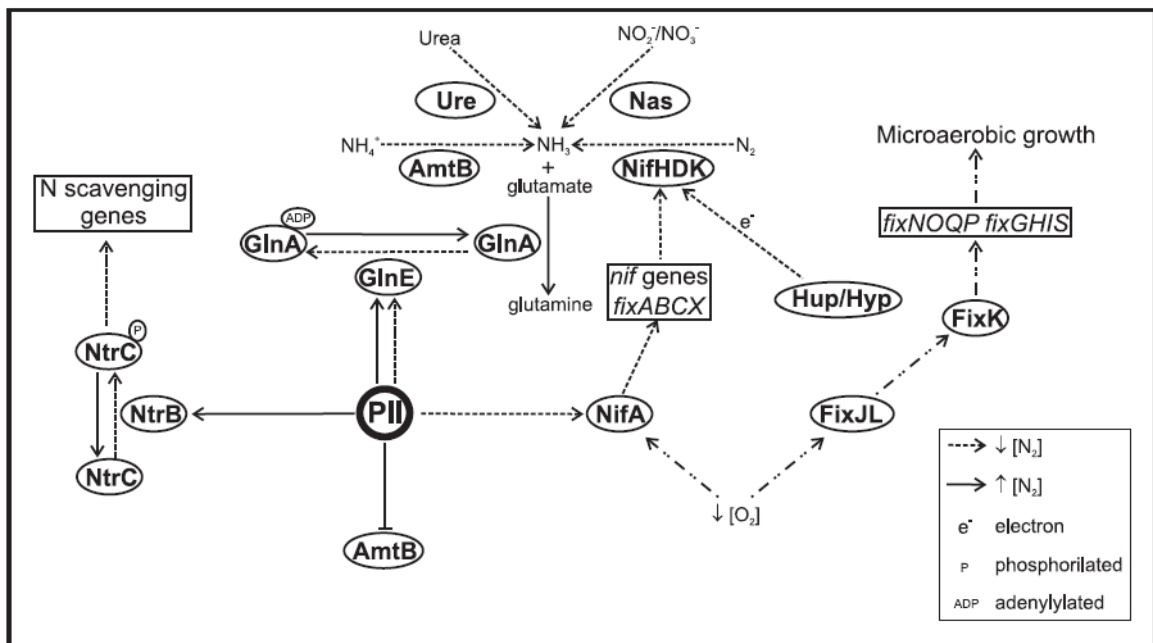


Figura 5: Modelo integrado de correlación entre el metabolismo del N y las rutas relacionadas a la energía para la fijación de dicho elemento.

Tomado de (Sant'Anna, et al., 2011).

La actividad fijadora de la bacteria solo se da bajo las condiciones mencionadas y es limitada por el NH₄, glutamina (GS), NO₃ y NO₂. Como la conversión de N₂ a NH₄⁺ es un proceso que demanda altas cantidades de energía y la nitrogenasa es altamente sensible al O₂, la conversión biológica de N₂ es un proceso fuertemente regulado en dos niveles e involucra tanto controles transcripcionales como postranscripcionales (Figura 6).

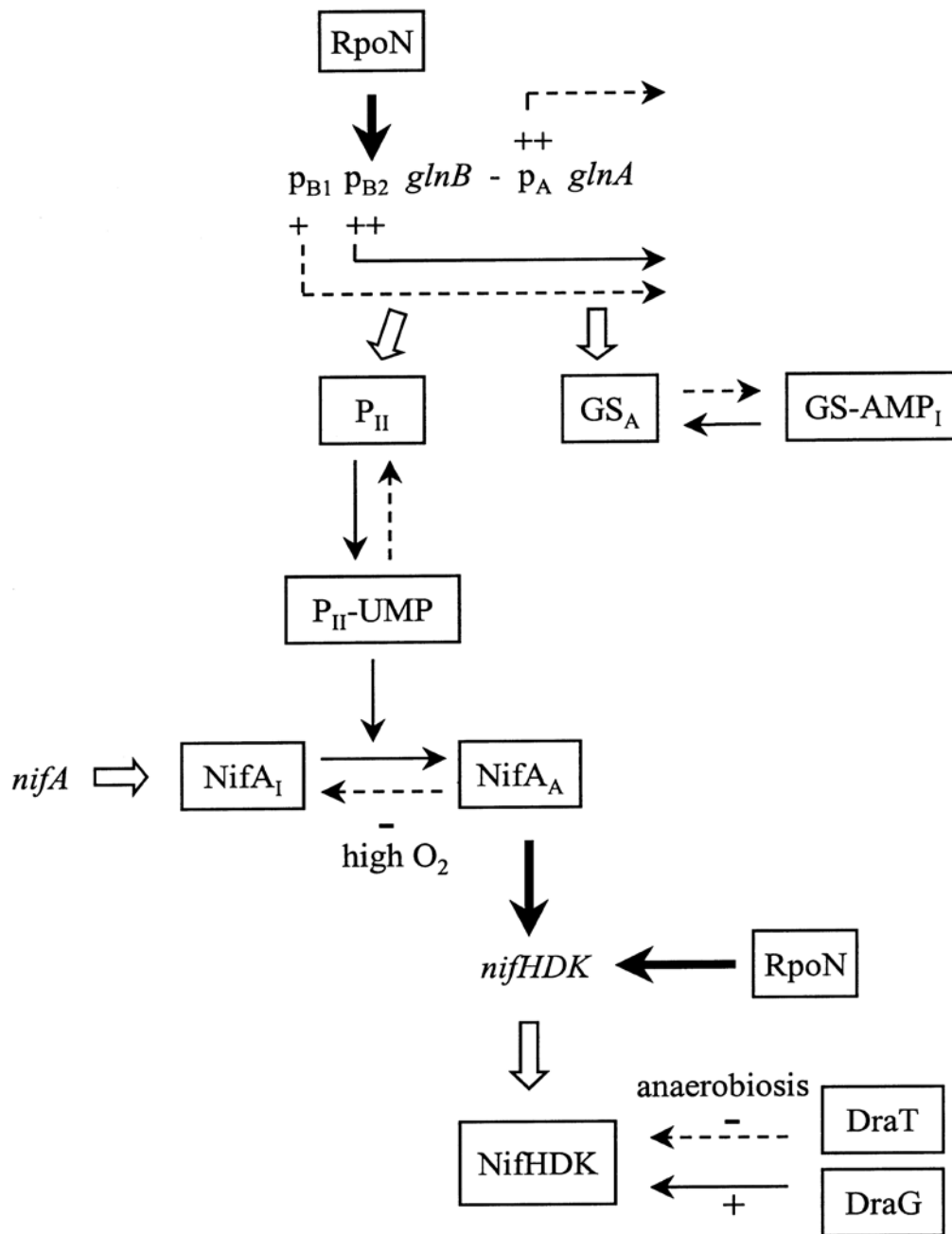


Figura 6: Modelo propuesto para la regulación de la biosíntesis de la nitrogenasa y su actividad en *Azospirillum brasilense*.

Tomado de (Steenhoudt & Vanderleyden, 2000)

a) Símbolos: transcripción (flechas abiertas), regulación positiva (+) o negativa (-) de la transcripción (flechas gruesas) y actividad (flechas delgadas), limitación de N₂ (líneas completas) y exceso de N (líneas punteadas), eficiencia relativa de los promotores de la transcripción (+++). GS, glutamina sintasa; AMP, adenosin monofosfato; UMP, uridin monofosfato; a, forma activa; i, forma inactiva.

Otra importante característica de *Azospirillum* spp. es la síntesis de IAA; siendo el Trp el precursor de este, por lo que la adición de este aminoácido generalmente mejora la producción de IAA. Se conocen tres vías para la conversión de Trp a IAA: la vía del ácido índol-3-pirúvico (IPya de sus siglas en inglés *indole-3-pyruvic acid*); la vía del indol-3-acetamida (IAM de sus siglas en inglés *indole-3-acetamide*) y la vía de la triptamina (TAM de sus siglas en inglés *Tryptamine*). Se ha observado que este género tiene dos vías dependientes de Trp y una tercera independiente de Trp, la cual aún no ha sido elucidada completamente: Con referencia a las dos primeras, aportan un valor aproximado del 10% de la producción total de IAA por la bacteria. La primera vía empieza en el Trp el cual es sometido a una descarboxilación oxidativa produciendo IAM y su subsecuente hidrólisis obteniendo IAA. La segunda vía de producción involucra IPya, siendo esta la de mayor importancia en las plantas (Steenhoudt & Vanderleyden, 2000). Esta ruta involucra la transamidación de Trp para producir IPya, seguido de una reacción de descarboxilación hacia indol-3-acetaldehído (IAAld de sus siglas en inglés *indole-3-acetaldehyde*) y su posterior oxidación da lugar a IAA (Figura 7) (Steenhoudt & Vanderleyden, 2000).

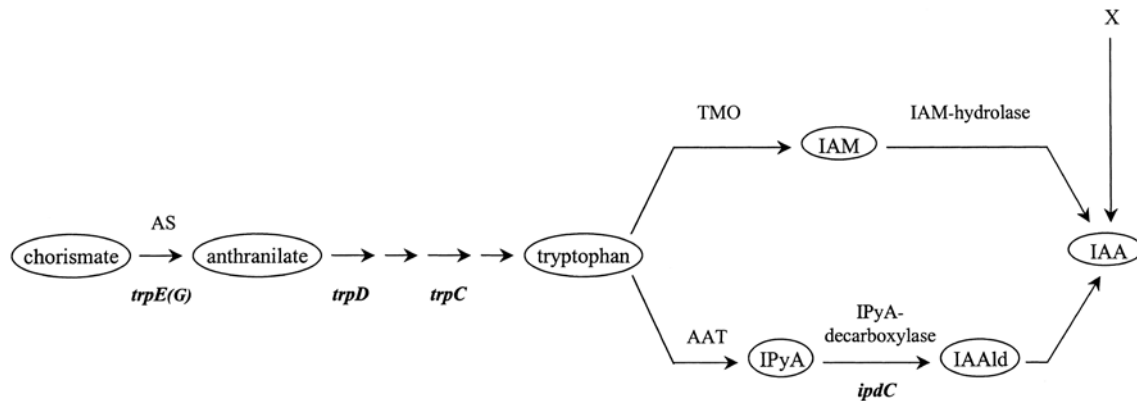


Figura 7: Vías biosintéticas para la producción de Trp e IAA en *Azospirillum brasilense*.

Tomado de (Steenhoudt & Vanderleyden, 2000)

a) IAM, indol-3-acetamida; IPyA ácido indol-3-pirúvico; IAAld, indol-3-acetaldehído; IAA, ácido indolacético; X, precursor desconocido; AS, antranilato sintasa; TMO, Tryptófano-2-monooxidasa; AAT, amino ácido aromático transferasa.

b) Los genes mencionados son los que han sido aislados y caracterizados en *Azospirillum brasilense*.

2.4. Casos de aplicación de *Azospirillum* spp.

Azospirillum spp. se lo ha utilizado en muchos cultivos para mejorar su eficiencia y producción. En el estudio realizado por Swedrzynska y Sawicka (2000) se evaluó la incidencia de la aplicación de la bacteria a semillas de maíz (*Zea mays*), para lo cual fueron estudiados 4 parámetros: actividad de la nitrogenasa; contenido de clorofila en las plantas; tamaño en cultivo y calidad. Los resultados obtenidos fueron que la bacteria contribuye a una correcta germinación y desarrollo de la plántula, además que se observó una mayor concentración de clorofila en la planta lo cual demuestra la calidad de la planta.

Si bien hay estudios en varias especies vegetales, la gran mayoría se centran en el trigo (*Triticum aestivum*), se ha observado que al aplicar *Azospirillum* spp. mejora el rendimiento del cultivo, la cantidad de proteínas en las semillas y la

absorción de minerales. En esta última, se destaca que además de una concentración mayor de nitrógeno también hay una mayor presencia de otros elementos como Fósforo (P), Potasio (K), Manganeseo (Mn) y Hierro (Fe), especialmente en concentraciones medias de la bacteria. El uso en altas concentraciones de *Azospirillum* spp. en cambio mejora la cantidad de proteínas totales al igual que de carbohidratos totales (Eleiwa, Hamed & Shehata, 2012).

El arroz (*Oryza sativa*) es otro cereal en donde se han realizado estudios para saber el efecto de *Azospirillum* spp. como se ve en el estudio de García, Muñoz, Carreño y Mendoza (2010). En este estudio se observó que todas las cepas de *Azospirillum* spp. incrementaron la altura y materia seca, además de que se observó niveles de efectividad de hasta el 126% más que los testigos. Debido a estos datos se concluyó que *Azospirillum* spp. es una alternativa viable para la disminución de fertilizantes químicos (García, et al., 2010).

A pesar de que el uso de la bacteria está más extendido en cereales, su aplicación se ha extendido también a varias hortalizas como pepino (*Cucumis sativus* L., cv. Gremlin), tomate (*Solanum lycopersicum* L., cv. Grosse lisse) y lechuga (*Lactuca sativa* L. Tipo "Salinas") especialmente aplicado a las semillas. En el caso de hortalizas se busca que la bacteria una mejor síntesis de ácido Indolacético (IAA). Se observó que la bacteria mejoró el desarrollo, especialmente el desarrollo radicular y la germinación de las semillas de las especies anteriormente citadas. En el estudio de Mangmang, Deaker y Rogers (2015a) se observó que en lo que se refiere a pepino, la bacteria mejoró el crecimiento de las semillas y el vigor, y que tuvo un aumento en la concentración de IAA de hasta un 55%; en lo que se refiere a lechuga, se observó un alza del 20% de IAA. Para finalizar, en tomate se obtuvo un incremento de hasta el 300%, todos estos valores en comparación con los controles usados.

Estudios realizados en cultivos hidropónicos de fresa (*Fragaria vesca*) demuestran la eficiencia de la aplicación de *Azospirillum* spp. para un mejor

desarrollo de frutas ya que se observó un mejor desarrollo del tallo y de las raíces, además de un mejor desarrollo de las hojas, a pesar, de que los datos no muestran una diferencia mayor. Otro dato importante es que todos los tratamientos con la bacteria tuvieron un promedio de contenido de nitrógeno en hojas de 2,42% a 2,83% lo cual es lo mejor para su cultivo. Por último, se concluyó que la bacteria además de brindar los beneficios mencionados mejoró el contenido de sólidos solubles (Darwin Rueda, et al., 2016).

3. Capítulo III. Diseño del plan experimental

El presente proyecto se realizó en condiciones controladas de invernadero, con riego cada dos días de un volumen establecido de dieta base. El diseño se montó bajo un DCA (Diseño Completamente al Azar). La variable independiente fue la concentración en Unidades Formadoras de Colonias (UFC's) de la bacteria, mientras que las variables dependientes se consideraron al crecimiento de raíces y hojas de las plantas de rosa medida a través de su tamaño y también expresada a través del peso seco de ambos componentes, finalmente el contenido en porcentaje de N en el suelo y a nivel foliar.

Los controles que se ejecutaron son los siguientes: un control en el cual se utilizó un fertilizante comercial con N (con dieta base) y uno en el que no se usó fertilizante nitrogenado ni se inoculó la bacteria (con dieta base), ejemplificado en la Tabla 3:

Tabla 3

Componentes que conforman cada tratamiento o control.

Tratamiento/Control	Dieta Base	Nitrógeno	UFC
Control con Nitrógeno	X	X	
Control sin Nitrógeno	X		
A	X		X
B	X		X
D	X		X
E	X		X

La unidad experimental consistió en un patrón de rosa por maceta obtenido de un vivero productor. Finalmente, se obtuvieron 4 tratamientos (A, B, D, E) y 2 controles, cada uno de los cuales tuvo 5 repeticiones, además se realizaron 3 réplicas biológicas que fueron distribuidas de la siguiente manera:

Tabla 4

Distribución espacial de los tratamientos y controles.

B1.1	A1.1	B1.2	A1.2	E1.3	B1.4
D1.1	C-1.2	C-1.3	C-1.4	B1.5	E1.2
E1.5	D1.2	C+1.5	E1.4	A1.3	D1.4
A1.4	C-1.1	A1.5	D1.5	C-1.5	B1.3
C+1.1	C+1.3	E1.1	C+1.4	D1.3	C+1.2

A2.1	C+2.5	A2.2	B2.2	D2.5	A2.4
E2.1	C-2.1	C-2.5	D2.4	C+2.3	D2.2
C+2.1	B2.1	B2.5	E2.5	B2.3	E2.4
A2.5	E2.2	C+2.2	C-2.4	C+2.4	A2.3
B2.4	C-2.3	D2.1	D2.3	E2.3	C-2.2

E3.1	C-3.5	E3.2	D3.2	E3.5	A1.3
A3.4	D3.1	C+3.3	C+3.4	C-3.3	E3.4
C-3.1	C+3.2	D3.5	B3.4	D1.3	B3.2
B3.5	A3.2	C-3.2	A3.5	C+3.5	A3.1
D3.4	C+3.1	B3.1	B3.3	C-3.4	E3.3

Simbología: C+: Control con N, C-: Control sin N, A; B; D; E: Tratamientos, la numeración indica: el primer número la repetición biológica a la que pertenece y el segundo número la repetición del control y/o tratamiento.

En la Figura 8 se aprecia el diagrama de flujo del diseño del plan experimental para desarrollar el presente proyecto.



Figura 8: Diseño del plan experimental para la realización de la evaluación de la actividad nitrificante de la bacteria *Azospirillum* spp.

4. Capítulo IV. Procedimientos

4.1. Población y Muestra

La muestra de estudio estuvo conformada por un total de 90 patrones de rosa, los cuales fueron sembrados en un invernadero bajo condiciones uniformes en la Universidad San Francisco de Quito (USFQ). Se utilizaron todos los patrones en la experimentación. La muestra se determinó basado en el diseño experimental y en la cantidad de repeticiones necesarias para tener resultados

estadísticamente concluyentes. Por lo tanto, la muestra está constituida por 60 patrones de rosa divididos de la siguiente manera: se usarán cuatro concentraciones distintas de la bacteria, las cuales se encontrarán en un rango de 10^1 a 10^{12} UFC's y se realizarán cinco repeticiones por concentración con un total de 20 patrones ($5 \times 4 = 20$). Además, se realizarán tres réplicas biológicas del experimento, por lo que el número total es de 60 patrones de rosa ($20 \times 3 = 60$). Se usarán cinco patrones como control positivo y cinco patrones como control negativo en cada una de las réplicas biológicas, por lo tanto, la suma final es de 90 patrones de rosa.

4.2. Materiales y Métodos para la obtención de datos.

4.2.1 Reconstitución de la cepa.

Se usó una cepa comercial de *Azospirillum* spp. brindada por Euroagro®, la cual se debe mantener a menos de 35°C . Para su resuspensión se realizó un cultivo en agar nutriente a 37°C durante 4 días. Después se realizó un cultivo en líquido para su conservación a 10°C .

4.2.2 Manejo de los bioensayos.

4.2.2.1 Aclimatación de los bioensayos.

Los patrones fueron aclimatados durante 7 días. La aclimatación consistió en el traspaso del patrón de la funda hacia una maceta con tierra previamente obtenida de una finca de producción florícola. Durante los 7 días se realizó un riego cada dos días el cual consistía en 50 mL de agua suplementados mediante una probeta a nivel de suelo.

4.2.2.2 Aplicaciones de los tratamientos.

Los bioensayos fueron sometidos a las mismas condiciones ambientales de manejo en la producción florícola por medio de un invernadero. El riego se lo realizó respetando la dieta base y la dieta asignada para cada repetición. La dieta base se describió en la tabla 5.

Tabla 5

Formulación de la dieta base de los patrones de rosa.

FERTILIZANTE	Aportes Diarios en:	4 L
	Tanque A	Unidad
Fosfato Monobásico de Potasio	0.5	g
Carbonato de Calcio	2.15	g
Sulfato de Hierro III	0.1	g
Sulfato de Manganeso	0.045	g
Sulfato de Zinc	0.028	g
Sulfato de Magnesio	1.2	g
Sulfato de Potasio	1.2	g
Sulfato de Cobre	0.0225	g
Molibdato de Sodio	0.00175	g
Ácido Bórico	0.0175	g

La dieta base fue común en cada uno de los tratamientos. La variación consistió en la modificación de la fuente de N en cada uno de los tratamientos. Así los tratamientos quedaron de la siguiente forma:

Tabla 6

Distribución de los tratamientos aplicados.

Tratamiento	Dieta Base +	
	Unidades Formadoras de Colonias (UFC's)	Fuente de Nitrógeno Exógena
A	1*10 ¹	-
B	1*10 ⁶	-
D	1*10 ⁹	-
E	1*10 ¹²	-
C+	-	Nitrato de Calcio (0,0033 M), Nitrato de Amonio (0,00086 M), Sulfato de Amonio (0,00065 M) y Molibdato de Amonio (3,44*10 ⁻⁷ M)
C-	-	-

Se realizó un riego de un día por medio de 50 mL para cada maceta, durante la mañana mediante una probeta directamente al suelo.

4.2.3 Determinación de parámetros.

4.2.3.1 Medición de tamaño aéreo y radicular del patrón.

Para la medición de la estructura aérea del patrón se usó un flexómetro. El tamaño fue medido desde el cuello de la raíz al ápice del tallo.

Para la medición de la estructura radicular del patrón se utilizó una piola para asemejar la geometría del patrón y así obtener medidas más exactas. Las raíces medidas fueron las de mayor grosor ya que este aspecto fisiológico demuestra la longevidad de la misma.

4.2.3.2 Medición del peso seco de la parte aérea y radicular del patrón.

Para la medición del peso seco del patrón se procedió a secar el patrón durante 3 días en una incubadora a 37°C para eliminar la humedad y el agua presente en el mismo. Para realizar el pesaje se cortó el patrón en el cuello para así dividir la parte aérea de la raíz. Cabe recalcar que la parte aérea se pesó posteriormente a la toma de hojas de muestra para su determinación del N.

4.2.4 Determinación de las formas de nitrógeno del suelo.

Para la determinación del N en suelo se siguió el protocolo redactado en (American Public Health Association, 2012).

Para determinar el NH_4^+ presente en las muestras de suelo se usó como referencia el método SM 4500-NH₃ E (American Public Health Association, 2012). Este parámetro fue medido empleando un electrodo selectivo de amonio Orion (Scientific, 2010) y un electrodo de referencia Orion (Scientific, 2010). La curva de calibración se realizó empleando soluciones estándar en un rango bajo de concentración de 1 a 10 mg NH_4^+ .L⁻¹ y en un rango alto de concentración de 10 a 100 mg NH_4^+ .L⁻¹. Los estándares fueron preparados a partir de una solución madre de 1000 mg L⁻¹ de NH_4^+ como cloruro de amonio (NH_4Cl). A 1 mL de una solución de ajuste de fuerza iónica (ISA amonio) se añadieron a 10 mL de cada estándar y se procedió a medir el potencial en mV con el electrodo de NH_4^+ y el electrodo de referencia. Los valores de potencial se graficaron en función del logaritmo base 10 de la concentración de NH_4^+ de acuerdo con lo establecido

por la ley de Beer y se obtuvo un RSQ de 0.99. Para analizar las muestras, 40 mL de agua destilada fueron agregados a 20 g de suelo de cada una de las muestras analizadas, la solución se mezcló adecuadamente. A continuación, se centrifugó las muestras durante 10 minutos y se tomaron 10 mL de sobrenadante al que se añadió 0.2 mL de solución de ISA. Se midió el potencial en mV. La concentración de NH_4^+ en cada muestra fue calculada en base a la curva de calibración descrita previamente. Los análisis se realizaron por duplicado.

El NO_3 presente en las muestras de suelo se determinó usando como referencia el método SM 4500- NO_3 D (American Public Health Association, 2012). Este parámetro fue medido empleando un electrodo selectivo de nitrato Orion (Scientific, 2010). La curva de calibración se realizó empleando soluciones estándar de rango alto de concentración de 100 a 1000 mg NO_3 .L-1. Los estándares fueron preparados a partir de una solución madre de 1000 mg NO_3 L-1 a partir de nitrato de sodio (NaNO_3). A 0.2 mL de una solución de ajuste de fuerza iónica (ISA nitrato) se añadieron a 10 mL de cada estándar y se procedió a medir el potencial en mV con el electrodo de NO_3 . Los valores de potencial se graficaron en función del logaritmo base 10 de la concentración de NO_3 de acuerdo con lo establecido por la ley de Beer y se obtuvo un RSQ de 0.99. Para analizar las muestras, 40 mL de agua destilada fueron agregados a 20 g de suelo de cada una de las muestras analizadas, la solución se mezcló adecuadamente. A continuación, se centrifugó las muestras durante 10 minutos y se tomaron 10 mL de sobrenadante al que se añadió 0.2 mL de solución de ISA. Se midió el potencial en mV. La concentración de NO_3 de cada muestra fue calculada en base a la curva de calibración descrita previamente. Los análisis se realizaron por duplicado.

4.2.5 Determinación del nitrógeno foliar.

La determinación de nitrógeno foliar fue realizada por Agrocalidad, para lo cual se envió muestras de al menos 2 g de hojas frescas. El análisis se realizó mediante el método Dumas PEE/SFA/58.

4.2.6 Evaluación estadística de los resultados

Finalmente, para el análisis estadístico se realizó un análisis de varianza (ANOVA) en el software SPSS para inferir si existen diferencias estadísticas significativas entre los distintos tratamientos de acuerdo con las variables de análisis. Posteriormente se realizó una prueba de Duncan para determinar entre pares de grupos de datos si hay diferencias significantes en cuanto a sus resultados.

Se realizaron tres réplicas experimentales para cada tratamiento con la bacteria, asegurando de esta manera minimizar el error experimental. También se realizaron tres réplicas biológicas para evitar que el sesgo sea influenciado por algún problema en específico en cierto patrón; o por la pérdida de datos debido a algún problema de otro tipo (sea por enfermedad o descuido del operador). Las condiciones de crecimiento y de riego fueron las mismas para todos los patrones minimizando y controlando de esta manera una posible influencia en los resultados.

5. Capítulo V. Resultados y Discusión

5.1. Reconstitución de *Azospirillum* spp.

Para la obtención de *Azospirillum* spp. se procedió a la reconstitución del producto, para lo cual se realizó un cultivo en agar nutriente como se observa en la Figura 9.



Figura 9: Cultivo obtenido a partir del producto proporcionado.

Para una mayor eficiencia en el crecimiento de la bacteria, se cambió el medio al recomendado por Cárdenas, Garrido, Bonilla y Baldani (2010) que consistió en el Agar Rojo Congo. Con este medio se realizaron nuevos subcultivos seriados como se aprecia en la Figura 10.

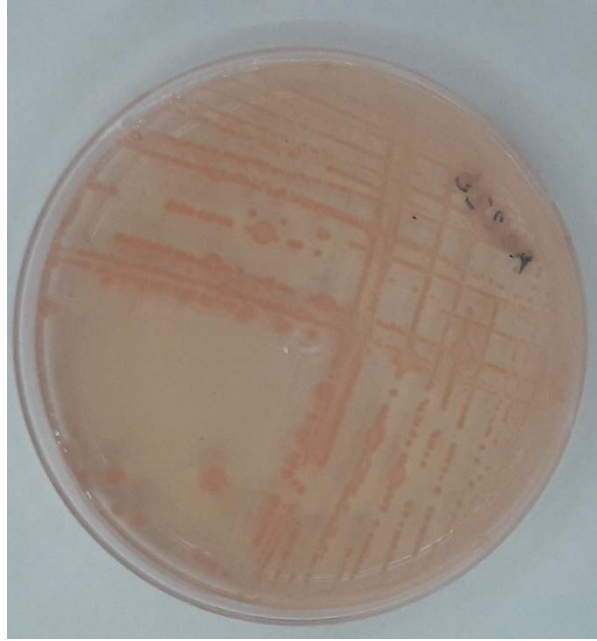


Figura 10: Crecimiento en medio Rojo Congo.

Para corroborar si la bacteria era *Azospirillum* spp. se realizó una microscopia con tinción gram, dando como resultado la presencia de bacterias con geometría en forma de vibroide, motilidad muy activa y gram negativas (Hossain, 2015). Además se observó que la morfología de las colonias concordaba con la descripción de Cárdenas, et al. (2010) como se presenta en la Figura 11.

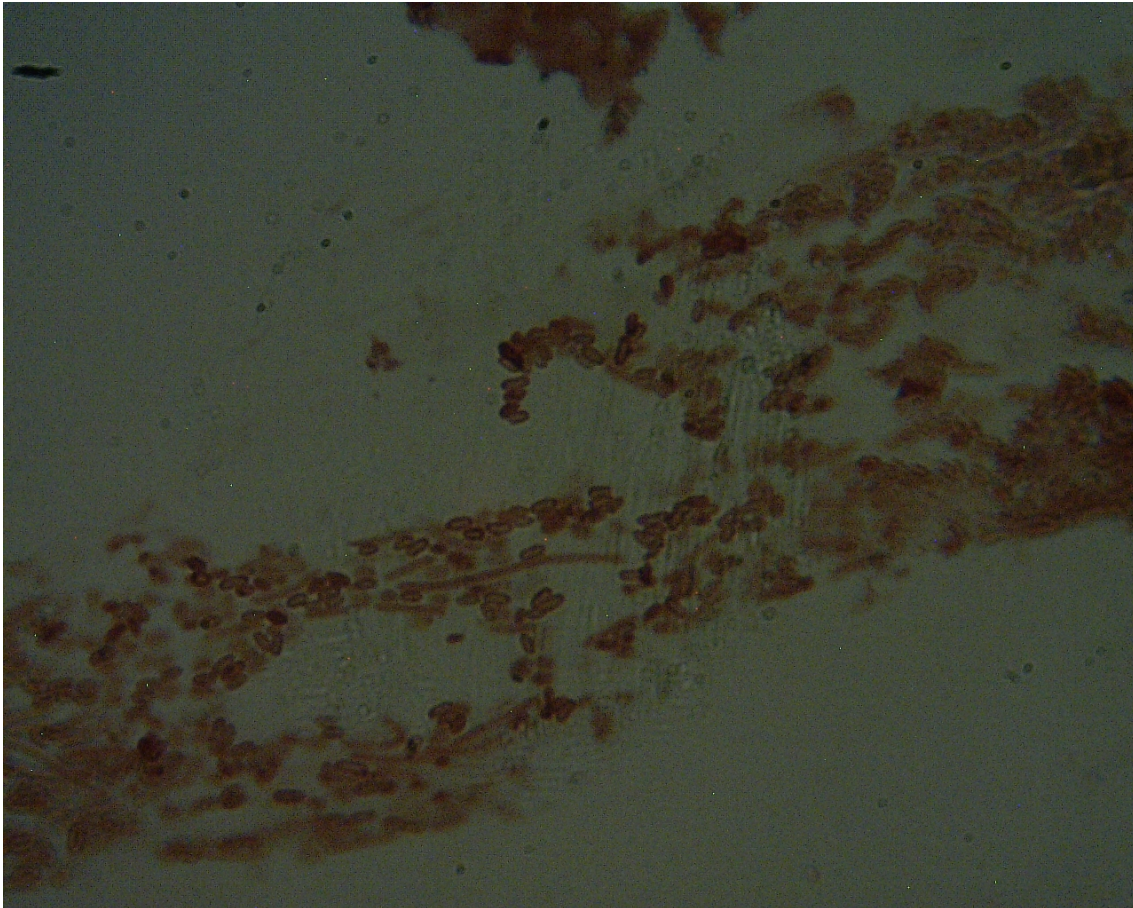


Figura 11: Microscopia en 100x del aislado en agar Rojo Congo.

5.2. Peso seco de raíz y tallo de los patrones de rosas con tratamientos de *Azospirillum* spp.

Para el análisis de los resultados del peso seco de raíz se utilizó el peso final, dando como resultado lo que se aprecia en la Figura 12. Estadísticamente los mejores tratamientos fueron A (10^1 UFC) y E (10^{12} UFC), sin embargo, cabe recalcar que los resultados también se ven influenciados por el grosor del cuello del tallo para la obtención del peso seco. Los tratamientos tienen mejores medias que los otros controles, demostrando que la bacteria podría tener un efecto benéfico en el desarrollo radicular.

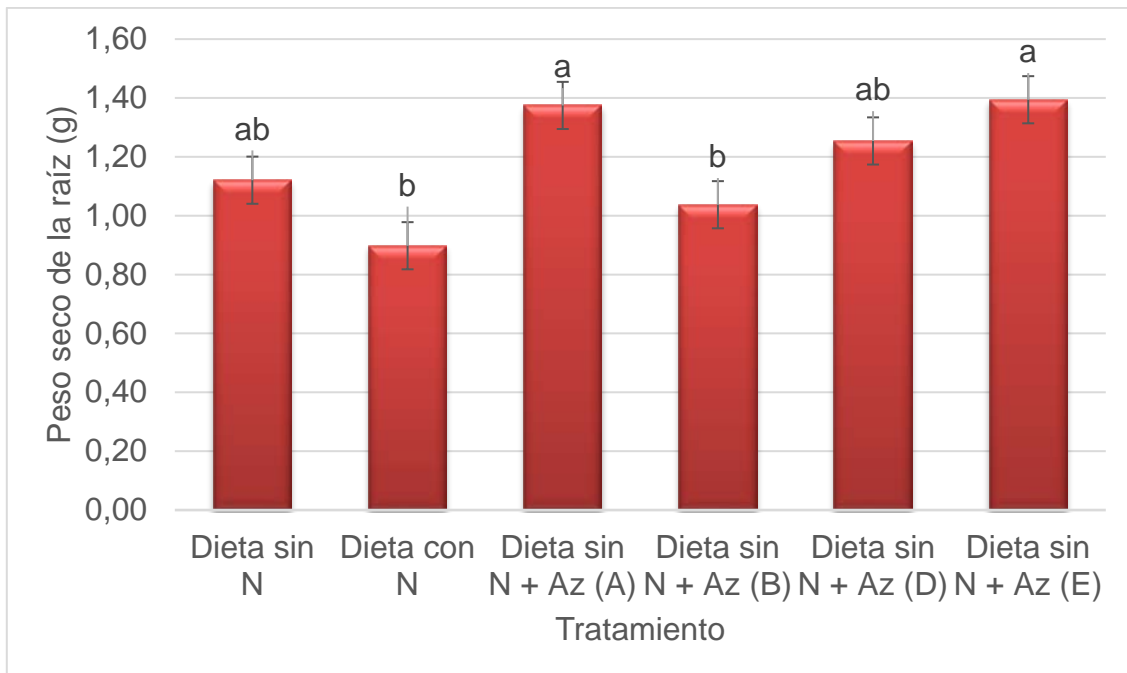


Figura 12: Comparación del peso seco de la raíz de cada uno de los tratamientos y controles.

a) Las letras (a, b y ab) que se muestran en la parte superior de las barras son los subgrupos que se obtuvieron después de realizar la Prueba de Duncan al 5%.

Otros estudios también han realizado la cuantificación de peso seco en raíz como Tilak y Subba Rao (1987) en donde se realiza la prueba de colonización de *Azospirillum* spp. en mijo perla (*Pennisetum glaucum*); sin embargo, para mejorar la colonización se realizaron incisiones en la raíz y se usó *Azospirillum* spp. previamente aislado. Los resultados obtenidos después de 3 años demostraron un rendimiento de 9.5 ± 2 g de peso seco de raíz que superaba en 3 gramos al control sin bacteria. En comparación con el estudio se observa que el peso seco de raíz en la presente investigación tiene la misma tendencia que con una experimentación del mismo tiempo de duración se obtendrían resultados concordantes como los reportados en el estudio citado, donde se demuestra que el tiempo de co-cultivo de la bacteria con la planta tiene una influencia directa en el resultado obtenido, esto se debe a la relación de simbiosis. En el trabajo de Cassán, Perrig, et al. (2009) también se observa que los tratamientos a los cuales se aplicó la bacteria tienen un mayor peso seco en comparación con el control después de 14 días, en este caso se usaron semillas de maíz (*Zea mays*) y de

soya (*Glycine max*), donde se observó que, de la misma manera aumentó la tasa de germinación. En el estudio realizado por Mangmang, Deaker y Rogers (2015b) en donde se inocula *Azospirillum* spp. a lechuga (*Lactuca sativa* L. tipo Salinas), se observa un aumento en el peso seco de la raíz después de 28 días; sin embargo, el aumento no es estadísticamente significativo, a pesar de ello, se observa un mejor desarrollo de las raíces secundarias, por lo que, se concluye que la bacteria mejora la tasa de germinación y ayuda a un mayor desarrollo de las raíces como ya se había expuesto. El suelo es un sustrato muy complejo el cual tiene muchas variaciones, a pesar de que se le aplique un mismo tratamiento. Se ha observado en este estudio, que la compactación del suelo tiene una injerencia directa en los beneficios que *Azospirillum* spp. tiene en el cultivo por varias razones: en primer lugar, sabemos que la raíz produce rizodeposiciones las cuales incluyen exudados, mucilagos, células y tejidos muertos y derbis de la raíz. Todos ellos tienen una relación directa con la actividad de la bacteria, por ejemplo, depende de los exudados para obtener azúcares y usarlos como fuente de carbono, de los cuales su biodisponibilidad depende de la motilidad que pueda tener *Azospirillum* spp. en el suelo, directamente relacionado con la compactación del mismo (Pedraza, et al., 2010). En segundo lugar, a todos estos compuestos se debe añadir a la producción de fitohormonas por parte de la planta como las auxinas. En este punto es importante recordar que la bacteria también produce IAA. Si la compactación del suelo es excesiva no solamente afecta el normal desarrollo de la raíz, sino también la movilidad de la bacteria y de todos los compuestos ya nombrados. Como observamos en el tratamiento B su desarrollo es menor al de los demás tratamientos, esto se puede deber a la acumulación de IAA debido a la compactación del suelo, el IAA tiene un efecto inhibitor del crecimiento cuando se encuentra en exceso, especialmente si su producción es exógena como lo reporta Rodrigues, et al. (2008).

Como se puede apreciar en la Figura 13, según la prueba de Duncan el tratamiento E es el mejor en comparación con los demás tratamientos para la variable peso seco de la parte aérea del patrón, especialmente en su comparación con el control con N donde se observa una diferencia visible.

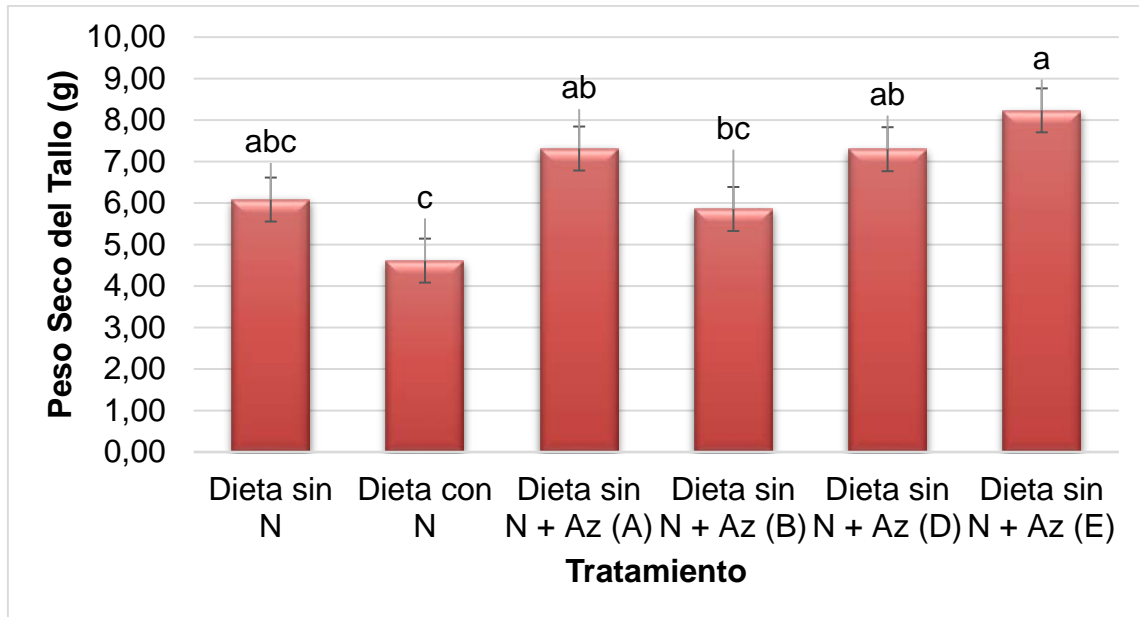


Figura 13: Comparación del peso seco de la parte aérea del patrón de cada uno de los tratamientos y controles.

a) Las letras (a, b, c, ab, bc y abc) que se muestran en la parte superior de las barras son los subgrupos que se obtuvieron después de realizar la Prueba de Duncan al 5%.

Dicho resultado se corrobora con el trabajo de Del Gallo y Fabbri (1991) donde se explica que una de las razones del mejor rendimiento en peso seco del tallo de la actividad nitrificante de la bacteria es el tiempo de co-cultivo, así como también depende de la variedad y del tipo de planta en el que se realiza la inoculación para tener un mejor o peor resultado. La variedad de la planta es importante en la influencia que tiene *Azospirillum* spp. en el cultivo. En el estudio de Araújo, Baldani, Galisa, Pereira y Baldani (2013) se observa que al evaluar dos variedades de arroz (*Oryza sativa*) Cana Roxa y Cana Forte, la bacteria tiene un efecto diferente, por ejemplo; la biomasa que se obtuvo al final es mayor en Cana Forte (48%) frente al que se obtuvo con la variedad Cana Roxa (28%). Esto último toma importancia, cuando se observa en otros estudios como el de Moutia, Saumtally, Spaepen y Vanderleyden (2010), que un factor fundamental es la relación que puedan establecer la bacteria con la variedad de la planta que se usa, razón por la cual se puede inferir que esto afectó a los resultados obtenidos en este experimento. Cabe recalcar que los resultados de tallo se corresponden con los de raíz, lo cual sigue una lógica ya que el desarrollo de la

planta está directamente relacionado con la absorción de nutrientes por parte de la raíz.

5.3. Evaluación del Tamaño de la parte radicular y aérea de los patrones de rosas en tratamiento con *Azospirillum* spp.

Para el análisis de los resultados del tamaño de la radicular y parte aérea se utilizó el diferencial del tamaño final con respecto del inicial. Como se observa en la Figura 14a el tratamiento E es el de mayor media de tamaño de la parte radicular, el cual supera en más de 2 cm en el diferencial del tamaño a todos los controles (figura 14b), por lo que la bacteria podría tener un efecto positivo en el desarrollo radicular, permitiéndole de esta forma tener un mejor anclaje y absorción de los nutrientes.

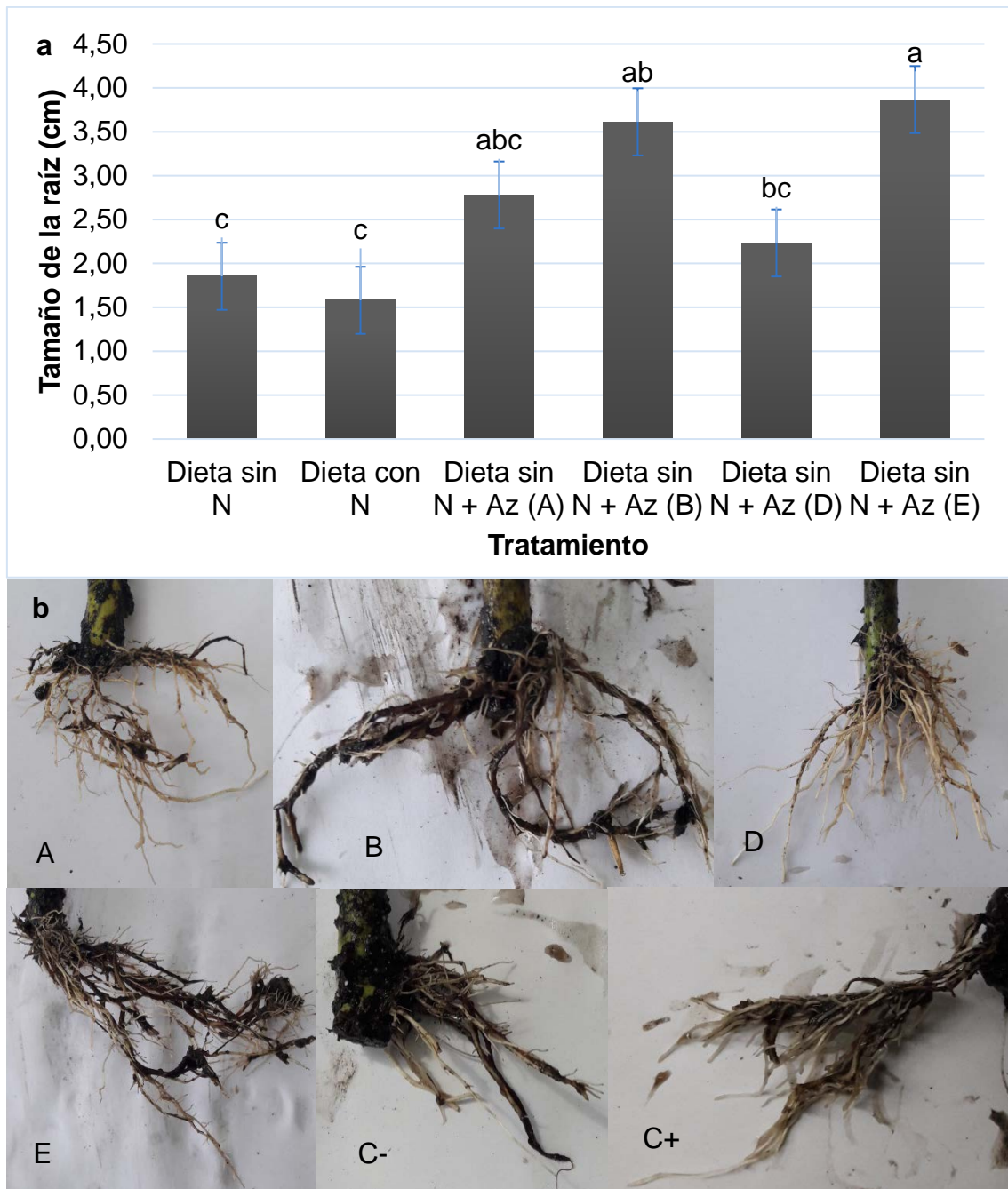


Figura 14: Comparación del diferencial del tamaño de la raíz de cada uno de los tratamientos.

a) Comparación estadística, las letras (a, ab, bc, abc y c) que se muestran en la parte superior de las barras son los subgrupos que se obtuvieron después de realizar la Prueba de Duncan al 5%.

b) Comparación visual, las letras A, B, D, E, C- y C+ representan cada uno de los tratamientos.

Este resultado coincide con lo reportado por Barbieri y Galli (1993) donde se puede observar un mejor desarrollo de la raíz principal y un mayor número de raíces secundarias en un estudio realizado en trigo (*Triticum durum*) en el que *Azospirillum brasilense* muestra mejores resultados. De la misma manera en el estudio realizado por Cassán, Maiale, et al. (2009) se observa un mayor desarrollo de la raíz principal de arroz (*Oryza sativa*) especialmente, en las plantas con mayor concentración de cadaverina (diamina asociada a la integridad de la superficie celular de las bacterias), lo cual demostraría una mayor presencia de la bacteria lo cual está directamente relacionado con el desarrollo de la raíz. Adicionalmente es importante mencionar que la bacteria no solo ayuda a un mejor desarrollo y mayor tamaño de la raíz principal ya que, también aumenta el desarrollo de las raíces secundarias y laterales, según el estudio de Molina-Favero, Creus, Simontacchi, Puntarulo y Lamattina (2008) las semillas de plantas de tomate (*Solanum lycopersicum*) inoculadas con *Azospirillum* spp. presentan un mayor porcentaje de raíces adventicias y de raíces laterales en un periodo de 6 días después de la germinación. Dos factores preponderantes en la actividad de la bacteria y su relación con la planta son la porosidad y tipo de sustrato, esto se debe a que la motilidad de la bacteria se ve influenciada por el tipo de suelo y la compactación que este tuvo, por lo que, es un elemento muy importante a tomar en cuenta en el estudio realizado, como lo demuestran Zambrano y Díaz (2008). El tratamiento E es el que mayor crecimiento registró, esto pudo deberse a que la bacteria produce IAA mejorando el crecimiento radicular de las plantas lo cual también se observa en los demás tratamientos. En lo que se refiere al tratamiento D que es el que menor crecimiento registró se puede deber a varias condiciones climáticas que se dan en la rizósfera, uno de los más importantes es la acidez que se encuentra en el suelo, ya que el transporte de los nutrientes se debe al intercambio catiónico que se da por la presencia de los protones en el suelo como se ve en el trabajo de Malhotra y Srivastava (2009). Otro de los factores que influyen la actividad de la bacteria es la cantidad de exudados que libera la planta, esto debido a que los exudados son la fuente de carbón que la bacteria necesita, por lo que, afectaría

a la asociación de *Azospirillum* spp. con los patrones de rosa (Pedraza, et al., 2010).

Con respecto al tamaño aéreo del patrón, el tratamiento E es el que mejor media presentó conforme a la figura 15a, especialmente si se lo compara con los controles (Figura 15b). En este caso el diferencial del tamaño también se ve influenciado por el tamaño inicial de los patrones que si bien fluctuó entre los 14 a 17 cm no era el mismo para la mayoría lo cual influye en el resultado obtenido.

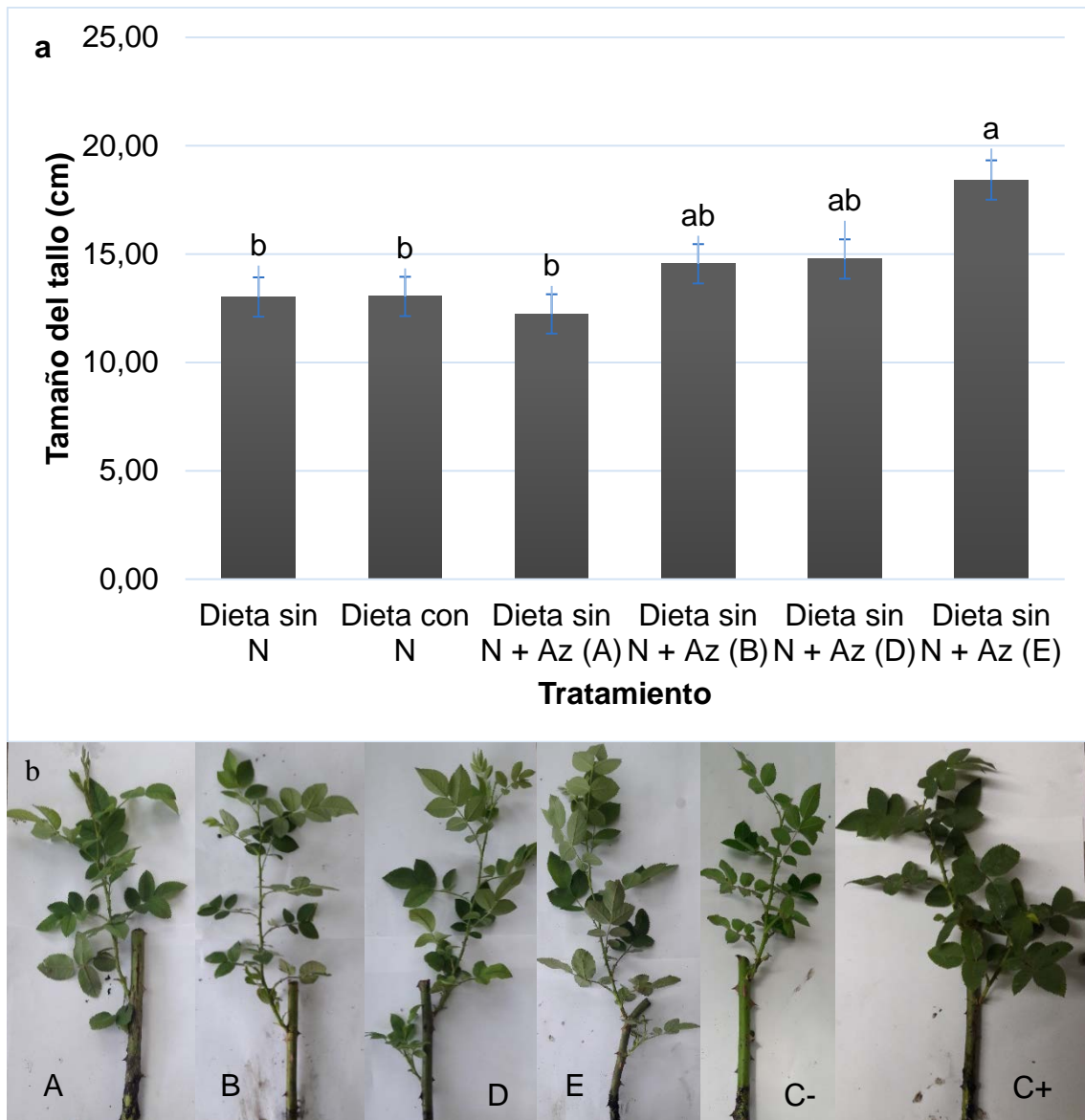


Figura 15: Comparación del diferencial del tamaño aéreo del patrón de cada uno de los tratamientos.

a) Comparación estadística, las letras (a, b, y ab) que se muestran en la parte superior de las barras son los subgrupos que se obtuvieron después de realizar la Prueba de Duncan al 5%.

b) Comparación visual, Las letras A, B, D, E, C- y C+ representan cada uno de los tratamientos.

En el estudio de Nezarat y Gholami (2009) se muestra que la inoculación con *Azospirillum* spp. en semillas de maíz (*Zea mays*) aumenta la altura de las plantas evaluadas entre un 14,3% a un 21,7% en comparación con los controles; sin embargo, en este estudio se usaron dos tipos de sustrato; uno estéril y otro no estéril, los cuales tuvieron una influencia en el estudio y en la actividad de la

bacteria. Romero, Correa, Moccia y Rivas (2003) obtienen un resultado comparable en tomate (*Solanum lycopersicum*) ya que logran un crecimiento mayor en un 131% más que el control, pero el efecto que se observa es mayor en tomate cherry (*Solanum lycopersicum* var. *Cerasiforme*) ya que se obtienen valores superiores en un 243% en comparación con los controles, mostrando la efectividad de la bacteria para el desarrollo vegetal. La producción de IAA es muy importante cuando vemos los resultados obtenidos, esto debido a que las auxinas promueven el crecimiento apical en el tallo que como se observa pudo haber influenciado en el mayor desarrollo del tallo en los patrones que fueron expuestos al tratamiento con las bacterias (Pedraza, et al., 2010).

5.4. Evaluación de la concentración de las formas de Nitrógeno en suelo.

Para el análisis de los resultados de la medición de N en el suelo se tomó en cuenta al NO_3 y NH_4 .

Se puede observar en la Figura 16, que con respecto al NH_4 , el tratamiento es el D, el cual tiene una concentración de 1×10^9 UFC de bacteria y supera en al menos 2 ppm a los controles.

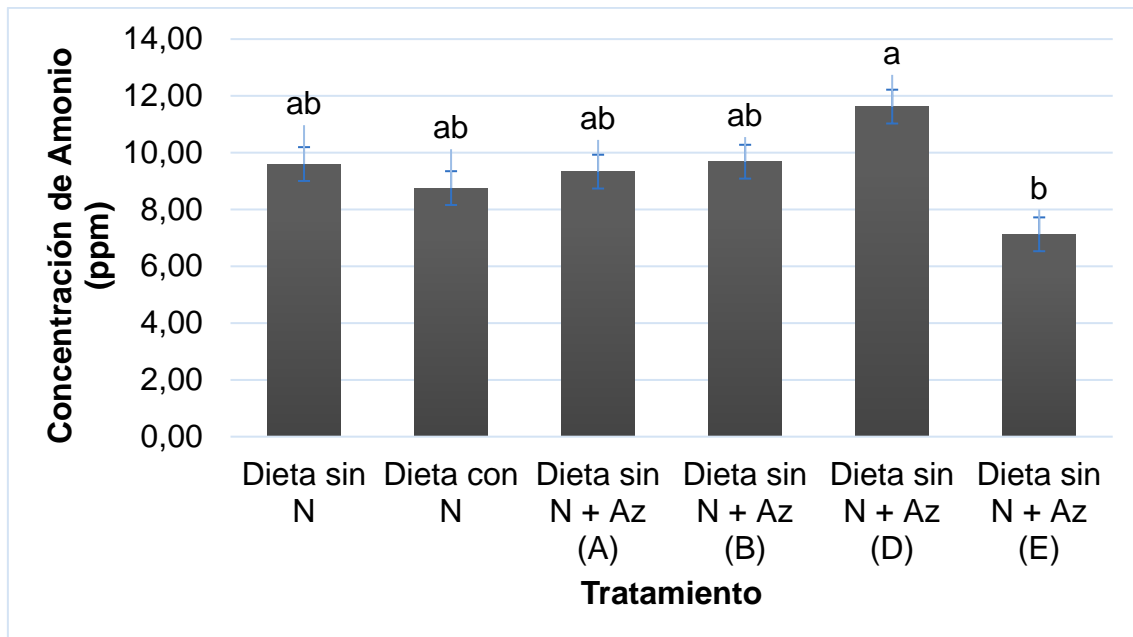


Figura 16: Comparación de la concentración de NH_4 en suelo de cada uno de los tratamientos y controles.

a) La letra (A) que se muestran en la parte superior de las barras es el subgrupo que se obtuvo después de realizar la Prueba de Duncan al 5%.

En un estudio realizado por Shawky (1990) donde se realiza una comparación de N ganado y perdido durante un período de 20 días en un medio suplementado con 100 mg de NH_4 , se puede observar que la fijación no es óptima ya que hay la presencia de más compuestos de N y esto afecta a la actividad nitrificante de la bacteria. Debido a que no existe una dieta que aporte N adicional al cultivo se puede ver una mejor actividad de la bacteria lo cual se puede corroborar con la fijación eficiente obtenida en el tratamiento D. El tratamiento E tuvo valores menores a los controles, el causal del cual puede deberse al consumo basal de amonio que tiene la bacteria para su supervivencia, ya que, el tratamiento E es el que mayor UFC tiene de los tratamientos es al que más pudo ver afectado por este consumo basal.

Por el contrario, el resultado obtenido para el NO_3 se aprecia en la Figura 17. Para dicha variable, el tratamiento D obtuvo la mayor concentración con un valor de 374 ppm a una concentración de bacteria de 1×10^9 UFC.

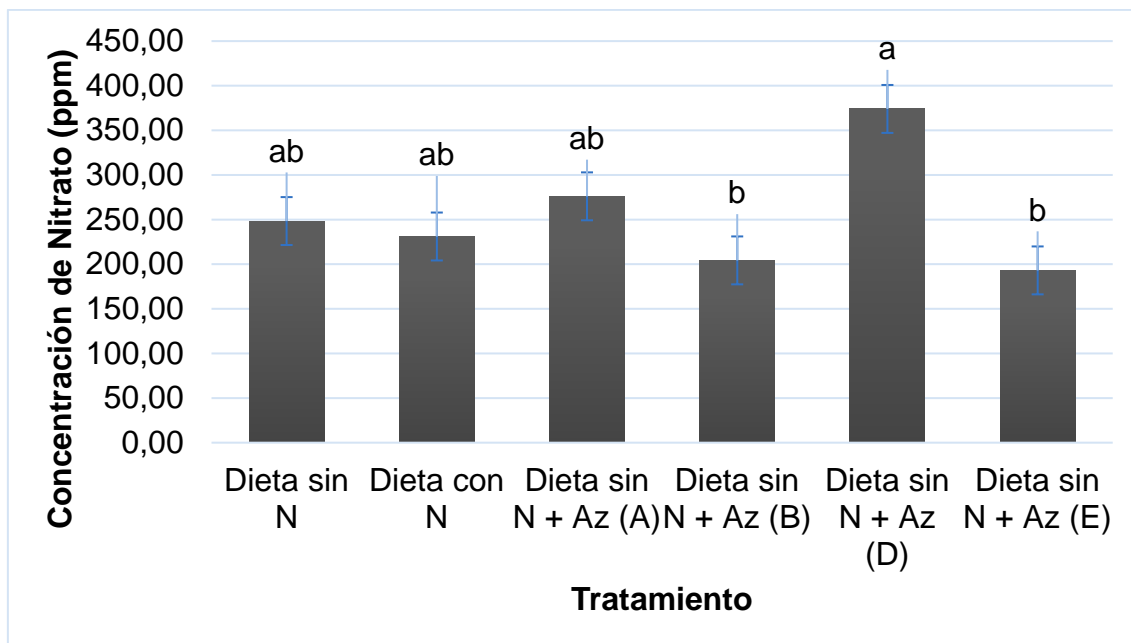


Figura 17: Comparación de la concentración de NO_3 en suelo de cada uno de los tratamientos y controles.

a) Las letras (A, B, y AB) que se muestran en la parte superior de las barras son los subgrupos que se obtuvieron después de realizar la Prueba de Duncan al 5%.

Este resultado se relaciona con lo expuesto por Steenhoudt y Vanderleyden (2000) donde la mayor concentración de NO_3 se produce con la aplicación de *Azospirillum* spp. a la concentración de 1×10^9 UFC. En el trabajo de Shawky (1990) las cepas tuvieron una ganancia de 11.9 ppm de NO_3 después de 20 días; sin embargo, como ya se citó en un estudio anterior, esto está directamente influenciado por el medio suplementado con NH_4 que se utilizó. Debido a esto la cantidad que se obtuvo es mayor a la reportada por Shawky (1990). En el trabajo de Creus, et al. (2005) se observa que si bien la fijación de nitrógeno se da en condiciones anaeróbicas o microaeróbicas, hay una parte de las bacterias que están en la superficie donde no se realiza fijación de nitrógeno. Cuando hay condiciones aeróbicas se produce óxido nítrico el cual se ha demostrado que influye directamente en el desarrollo de raíces laterales el cual aumenta en la presencia de este compuesto (Creus, et al., 2005). La baja producción en los tratamientos B y E se puede deber a una mayor producción de IAA por parte de *Azospirillum* spp. (ya que registraron mayor crecimiento radicular y aéreo). Se ha observado que ha mayor producción de IAA hay una menor fijación de nitrógeno,

esto se debe a que cuando el nitrógeno es limitante aumenta la fijación de nitrógeno y baja la producción de IAA (Malhotra & Srivastava, 2009).

5.5. Evaluación del Nitrógeno Foliar en patrones de rosas aplicados con *Azospirillum* spp.

El resultado del análisis del porcentaje de N foliar se observa en la Figura 18. Se aprecia que el mayor contenido de N foliar se obtiene en los tratamientos: B (10^6 UFC), con una concentración de 3.19% de N y D (10^9 UFC) con un 3.09% de N.

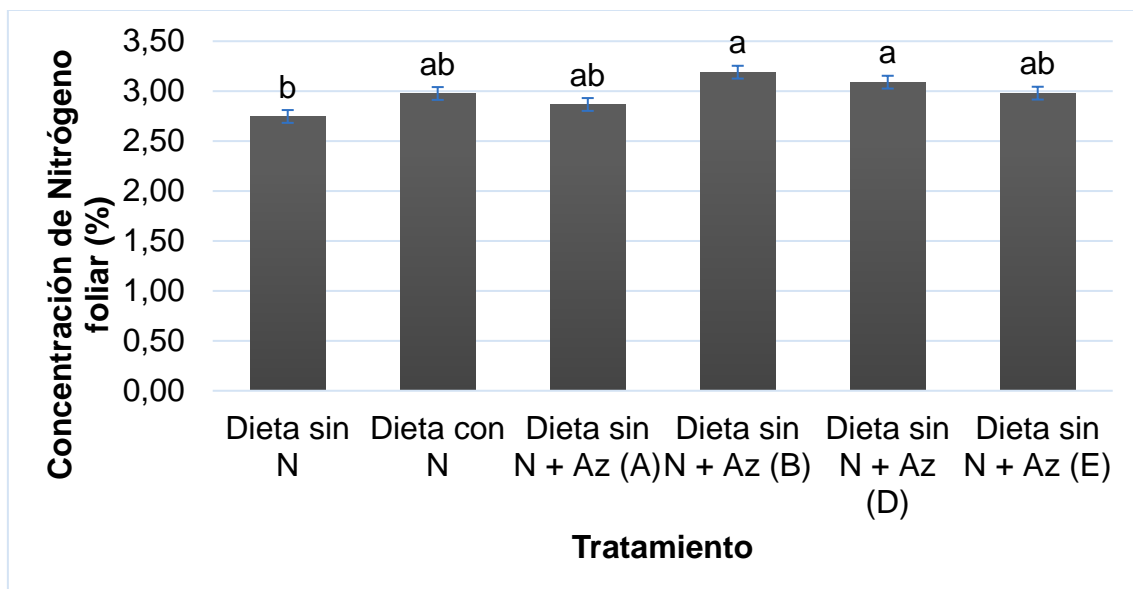


Figura 18: Comparación de cada uno de los tratamientos y controles.

a) Las letras (A, B, y AB) que se muestran en la parte superior de las barras son los subgrupos que se obtuvieron después de realizar la Prueba de Duncan al 5%.

Las diferencias entre estos tratamientos con los controles fluctúan entre 0.5 y 1%, demostrando que la bacteria no solo fija el N en el suelo sino también lo hace más accesible a la planta; sin embargo, la diferencia no es mayor debido al tiempo de experimentación como se ve en el estudio de Fayez (1987 en el cual también se logra observar una mejor absorción de N y otros elementos gracias a la interacción de *Azospirillum* spp. con las plantas de algodón (*Gossipium*

barbadense), donde se obtuvo una concentración de N foliar entre un 4.6% a 22.2% mayor en comparación a los controles, pero este estudio se realizó en un tiempo de 35 días con una inoculación realizada a nivel de la semilla. Otro estudio que demuestra la clara influencia de *Azospirillum* spp. en la mejor absorción de nutrientes por parte de la planta es el realizado por Pacovsky (1985), en el cual se observa que los niveles foliares de muchos nutrientes aumentaron, aun cuando en el nivel de N no se obtuvo una diferencia significativa entre el control y la inoculación con la bacteria. Cabe recalcar que la bacteria aumenta la biodisponibilidad del nitrógeno en suelo; sin embargo, como se ha explicado ya, su absorción y la estabilidad de la interacción entre la bacteria y el patrón se ve afectado por varias condiciones en el sustrato.

6. Conclusiones y Recomendaciones

6.1. Conclusiones

Se obtuvo una diferencia estadísticamente significativa en el peso seco de la raíz y de la parte aérea del patrón en el cual el mejor tratamiento fue E (10^{12} UFC) donde se obtuvo un peso final de 1.37 g y 8.23 g, respectivamente. Esta diferencia es un 55% y un 78,5% mayor en comparación con el control positivo, logrando una mayor biomasa de los patrones de rosa, debido a una posible mayor producción de IAA por parte de *Azospirillum* spp.

Se observó que en las variables diferencial del tamaño de la raíz y del tallo el tratamiento E (10^{12} UFC) generó los valores más altos (12.45 cm y 34.44 cm, respectivamente). Estos valores son un 145% y un 41% mayores al control positivo, esto debido a la mayor disponibilidad de los nutrientes en suelo, además de las fitohormonas auxínicas que mejoran el desarrollo de las raíces laterales y secundarias, además de un mayor crecimiento apical del tallo del patrón de rosa.

La mayor fijación de amonio y de nitrato, se cuantificó en el tratamiento D (10^9 UFC), con valores de 11.62 ppm para amonio y de 193.05 ppm para nitrato. Esta fijación es mayor en 32,79% y un 61,87%; respectivamente, en comparación al control positivo ya que, la actividad de la bacteria es alta y no se vio afectado por otras formas de nitrógeno en suelo.

Los tratamientos B (10^6 UFC) y D (10^9 UFC) fueron los que alcanzaron mayor concentración de nitrógeno foliar con valores de 3.19% y 3.09%, respectivamente. Estos tratamientos fueron un 7,17% y un 3,81% mayores al control positivo, a causa de que la bacteria mejoró la fijación y la disponibilidad del nitrógeno en suelo.

Se observó que *Azospirillum* spp. fija eficientemente nitrato y amonio, además de que produce IAA en suelo mejorando el desarrollo morfológico de los patrones de rosa, logrando un mejor desarrollo radicular y del tallo del patrón.

6.2. Recomendaciones

Se precisa realizar un estudio de mayor duración para evaluar de mejor manera los efectos de la inoculación de *Azospirillum* spp. en patrones de rosa.

Se recomienda realizar el mismo estudio en campo, ya que a pesar de que las condiciones ambientales se simularon no se puede simular el manejo en campo de una finca florícola.

Se recomienda realizar estudios de cómo afecta la fertilización normal y la aplicación de pesticidas y fungicidas en el desarrollo de *Azospirillum* spp.

Referencias

- ACCIÓN ECOLÓGICA, AE. (2000). Las Flores y sus Espinas: Impactos socioambientales de los cultivos de flores. Recuperado el 12 de Diciembre de 2016 de <http://edualter.pangea.org/material/sobirania/>.
- American Public Health Association, American Water Works Association, Water Environment Federation. (2012). *Standard Methods For the Examination of Water and Wastewater* (Eugene; Baird Rice, Rodger; Eaton, Andrew; Celsceri, Lenore. Ed. 22 ed.). 800 I Street, NW Washington, DC: American Public Health Association.
- Araújo, Antonio Edilson da Silva, Baldani, Vera Lúcia Divan, Galisa, Péricles de Souza, Pereira, José Almeida y Baldani, José Ivo. (2013). Response of traditional upland rice varieties to inoculation with selected diazotrophic bacteria isolated from rice cropped at the Northeast region of Brazil. *Applied Soil Ecology*, 64, 49-55. doi:dx.doi.org/10.1016/j.apsoil.2012.10.004
- Arias, Sandra Cristina, Pérez, Juan Carlos y Rueda, Orfely María. (2004). LIXIVIACIÓN DE NITRATOS EN DOS SUELOS AL ALTERAR SUS PROPIEDADES FÍSICAS. *Revista EIA*, 35-40.
- Barbieri, P. y Galli, E. (1993). Effect on wheat root development of inoculation with an *Azospirillum brasilense* mutant with altered indole-3-acetic acid production. *Research in Microbiology*, 144(1), 69-75. doi:dx.doi.org/10.1016/0923-2508(93)90216-O
- Beneduzi, Anelise, Ambrosini, Adriana y Passaglia, Luciane M. P. (2012). Plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR): Their potential as antagonists and biocontrol agents. *Genetics and Molecular Biology*, 35(4 Suppl), 1044-1051. doi:dx.doi.org/10.1016/j.jksus.2013.05.001
- Binkley, Dan y Vitousek, Peter. (1989). Soil nutrient availability. En Robert W. Pearcy, James R. Ehleringer, Harold A. Mooney, & Philip W. Rundel (Eds.), *Plant Physiological Ecology: Field methods and instrumentation* (pp. 75-96). Dordrecht: Springer Netherlands.

- Cárdenas, Diana M, Garrido, María F, Bonilla, Ruth R y Baldani, Vera L. (2010). Aislamiento e identificación de cepas de *Azospirillum* sp. en pasto guinea (*Panicum maximum* Jacq.) del Valle del Cesar. *Pastos y Forrajes*, 33, 1-1.
- Cárdenas Reinoso, Darío Andrés; y Touma Faytong, Mario Alberto. (2011). *Estudio comparativo de dos métodos de fertilización del cultivo de Arroz: usando briquetas de úrea con diferentes concentraciones de zeolita y el sistema tradicional en la zona Febres Cordero - Provincia de Los Ríos.* (Ingeniero Agrícola), Escuela Politécnica del Litoral. Recuperado el 13 de Febrero de 2017 de <https://www.dspace.espol.edu.ec/bitstream/123456789/19161/2/TESIS%20FINAL%202.pdf>.
- Cassán, Fabricio, Maiale, Santiago, Masciarelli, Oscar, Vidal, Alfonso, Luna, Virginia y Ruiz, Oscar. (2009). Cadaverine production by *Azospirillum brasilense* and its possible role in plant growth promotion and osmotic stress mitigation. *European Journal of Soil Biology*, 45(1), 12-19. doi:dx.doi.org/10.1016/j.ejsobi.2008.08.003
- Cassán, Fabricio, Perrig, Diego, Sgroy, Verónica, Masciarelli, Oscar, Penna, Claudio y Luna, Virginia. (2009). *Azospirillum brasilense* Az39 and *Bradyrhizobium japonicum* E109, inoculated singly or in combination, promote seed germination and early seedling growth in corn (*Zea mays* L.) and soybean (*Glycine max* L.). *European Journal of Soil Biology*, 45(1), 28-35. doi:dx.doi.org/10.1016/j.ejsobi.2008.08.005
- Creus, Cecilia M., Graziano, Magdalena, Casanovas, Elda M., Pereyra, María A., Simontacchi, Marcela, Puntarulo, Susana, . . . Lamattina, Lorenzo. (2005). Nitric Oxide is Involved in the *Azospirillum brasilense*-induced Lateral Root Formation in Tomato. *Planta*, 221(2), 297-303. doi:10.1007/s00425-005-1523-7
- Darwin Rueda, Gabriel Valencia, Norman Soria, B. Bryan Rueda, Bangeppagari Manjunatha, Rajesh R. Kundapur y Selvanayagam, Mariadoss. (2016). Effect of *Azospirillum* spp. and *Azotobacter* spp. on the growth and yield of strawberry (*Fragaria vesca*) in hydroponic system under different

- nitrogen levels. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*, 6(1), 1-7. doi:10.7324/JAPS.2016.600108
- Das, Amaresh y Mishra, Ajit K. (1984). Aerotolerant growth in *Azospirillum brasilense* induced by dihydroxyphenyl iron-binding compound. *Current Microbiology*, 11(6), 313-315. doi:10.1007/bf01567697
- Del Gallo, Maddalena y Fabbri, Paola. (1991). Effect of soil organic matter on chickpea inoculated with *Azospirillum brasilense* and *Rhizobium leguminosarum* bv. *ciceri*. *Plant and Soil*, 137(1), 171-175.
- Dirección de Inteligencia Comercial e Inversiones, PRO ECUADOR. (2014). Evolución Enero-Diciembre 2013 Exportaciones Ecuatorianas. Recuperado el 4 de Octubre de 2016 de <http://www.comercioexterior.gob.ec/wp-content/uploads/downloads/2014/04/EXPORTACIONES-ENE-DIC-2013-vs-2012.pdf>.
- Eleiwa, Mona E., Hamed, Eman R. y Shehata, Heba Sh. (2012). Biofertilizers and/or some micronutrients role on wheat plants grown on newly reclaimed soil. *African Journal of Ecology*, 50(4), 464-475. doi:10.1111/j.1365-2028.2012.01342.x
- ExpoFlores. (2013). Ecuador: El Sector Floricultor. Recuperado el 4 de Abril de 2017 de <https://www.slideshare.net/florecuador/floricultura-2013-amayo>.
- ExpoFlores. (2017). Informe Primer Timestre 2017. Recuperado el 20 de Junio de 2017 de <http://expoflores.com/wp-content/uploads/2017/06/INFORMETRIMESTRAL1.pdf>.
- Fayez, M.; Daw, Z.Y. (1987). Effect of inoculation with different strains of *Azospirillum brasilense* on cotton (*Gossypium barbadense*). *Biology and fertility of soils.*, 4(2), 1-5.
- Food and Agriculture Organization of the United Nations, FAO. (2015, 12 de Febrero de 2017). Anuario estadístico de la FAO 2015. 2014. Recuperado el 24 de Mayo de 2017 de <http://www.fao.org/economic/ess/ess-publications/anuario-estadistico/es/#.V0ToKr6xXIU>.
- García, Franklin, Muñoz, Harold, Carreño, Carmen y Mendoza, Gilmar. (2010). Caracterización de cepas nativas de *Azospirillum* spp. y su efecto en el

- desarrollo de *Oryza sativa* L. "arroz" en Lambayeque. 2010, 1(2), 10. doi:10.17268/sci.agropecu.2010.02.01
- Hierro, Óscar del, Atxaerandio, Raquel y García, Aser. (2015, 30 de Diciembre). Análisis del papel de los fertilizantes minerales en una agricultura sostenible a través de la huella de carbono. Recuperado el 29 de Junio de 2017 de <http://www.interempresas.net/Grandes-cultivos/Articulos/148871-Analisis-papel-fertilizantes-minerales-agricultura-sostenible-huella-carbono.html>.
- Hossain, Md Mozammel; Iffat, Jahan; Salina, Akter; Md, Rahman; S, Rahman. (2015). Isolation and Identification of *Azospirillum* Isolates from Different Paddy Fields of North Bengal. *Indian Journal of Research in Pharmacy and Biotechnology*, 1-7.
- Instituto Nacional de Estadística y Censos, INEC. (2014). Uso y Manejo de Agroquímicos en la Agricultura. Recuperado el 12 de Marzo de 2017 de http://www.ecuadorencifras.gob.ec/documentos/web-inec/Encuestas_Ambientales/plaguicidas/Plaguicidas-2014/Modulo_Uso_y_Manejo_de_Agroquimicos.pdf.
- Isermann, K. (1994). Agriculture's share in the emission of trace gases affecting the climate and some cause-oriented proposals for sufficiently reducing this share. *Environmental Pollution*, 83(1), 95-111. doi:dx.doi.org/10.1016/0269-7491(94)90027-2
- Kapulnik, Y., Okon, Y. y Henis, Y. (1987). Yield response of spring wheat cultivars (*Triticum aestivum* and *T. turgidum*) to inoculation with *Azospirillum brasilense* under field conditions. *Biology and Fertility of Soils*, 4(1), 27-35. doi:10.1007/bf00280347
- Malhotra, Mandira y Srivastava, Sheela. (2009). Stress-responsive indole-3-acetic acid biosynthesis by *Azospirillum brasilense* SM and its ability to modulate plant growth. *European Journal of Soil Biology*, 45(1), 73-80. doi:dx.doi.org/10.1016/j.ejsobi.2008.05.006
- Mangmang, Jonathan S., Deaker, Rosalind y Rogers, Gordon. (2015a). Optimal plant growth-promoting concentration of *Azospirillum brasilense* inoculated to cucumber, lettuce and tomato seeds varies between

- bacterial strains. *Israel Journal of Plant Sciences*, 62(3), 145-152. doi:10.1080/07929978.2015.1039290
- Mangmang, Jonathan S., Deaker, Rosalind y Rogers, Gordon. (2015b). Response of lettuce seedlings fertilized with fish effluent to *Azospirillum brasilense* inoculation. *Biological Agriculture & Horticulture*, 31(1), 61-71. doi:10.1080/01448765.2014.972982
- Marin, Fredy (2016, 5 de Marzo). [Relación Costos Ganancias en la Producción de Rosas].
- Martínez Gaspar, Felipe De Jesús, Ojeda Barrios, Dámaris L., Hernández Rodríguez, O. Adriana, Martínez Téllez, Jaime J. y De La O Quezada, Guadalupe. (2011). EL EXCESO DE NITRATOS: un problema actual en la agricultura. *Synthesis*, 57, 11 - 16.
- Molina-Favero, Celeste, Creus, Cecilia Mónica, Simontacchi, Marcela, Puntarulo, Susana y Lamattina, Lorenzo. (2008). Aerobic Nitric Oxide Production by *Azospirillum brasilense* Sp245 and Its Influence on Root Architecture in Tomato. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 21(7), 1001-1009. doi:10.1094/MPMI-21-7-1001
- Moutia, Jean-Francois Yvan, Saumtally, Salem, Spaepen, Stijn y Vanderleyden, Jos. (2010). Plant growth promotion by *Azospirillum* sp. in sugarcane is influenced by genotype and drought stress. *Plant and Soil*, 337(1), 233-242. doi:10.1007/s11104-010-0519-7
- Nezarat, S. y Gholami, A. (2009). Screening plant growth promoting rhizobacteria for improving seed germination, seedling growth and yield of maize. *Pak J Biol Sci*, 12(1), 26-32.
- Pacovsky, R. S.; Paul, E. A.; Bethlenfalvay, G. J. (1985). Nutrition of sorghum plants fertilized with nitrogen or inoculated with *Azospirillum brasilense*. *Plant and Soil*, 85(1), 145-148. doi:10.1007/BF02197807
- Pedraza, Raúl O., Motok, Jessica, Salazar, Sergio M., Ragout, Alicia L., Mentel, María I., Tortora, María L., . . . Díaz-Ricci, Juan C. (2010). Growth-promotion of strawberry plants inoculated with *Azospirillum brasilense*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 26(2), 265-272. doi:10.1007/s11274-009-0169-1

- ProEcuador. (2016a). Análisis Sectorial Rosas Frescas. Recuperado el 10 de Enero de 2017 de http://www.proecuador.gob.ec/wp-content/uploads/2016/12/PROEC_AS2017_ROSASFRESCAS.pdf.
- ProEcuador. (2016b). Informe Anual de Exportaciones de Flores 2015. Recuperado el 8 de Octubre de 2016 de <https://sway.com/arNI7HuKwaUWESr2>.
- Rodrigues, Elisete Pains, Rodrigues, Luciana Santos, de Oliveira, André Luiz Martinez, Baldani, Vera Lucia Divan, Teixeira, Kátia Regina dos Santos, Urquiaga, Segundo y Reis, Veronica Massena. (2008). Azospirillum amazonense inoculation: effects on growth, yield and N₂ fixation of rice (*Oryza sativa* L.). *Plant and Soil*, 302(1), 249-261. doi:10.1007/s11104-007-9476-1
- Romero, A. M., Correa, O. S., Moccia, S. y Rivas, J. G. (2003). Effect of Azospirillum-mediated plant growth promotion on the development of bacterial diseases on fresh-market and cherry tomato. *Journal of Applied Microbiology*, 95(4), 832-838. doi:10.1046/j.1365-2672.2003.02053.x
- Sant'Anna, Fernando H., Almeida, Luiz G. P., Cecagno, Ricardo, Reolon, Luciano A., Siqueira, Franciele M., Machado, Maicon R. S., . . . Schrank, Irene S. (2011). Genomic insights into the versatility of the plant growth-promoting bacterium *Azospirillum amazonense*. *BMC Genomics*, 12, 409-409. doi:10.1186/1471-2164-12-409
- Scientific, Thermo, (2010), Thermo Scientific Orion Star™ and Star Plus Meter User Guide, Beverly, Massachusetts, Estados Unidos, Recuperado el 27 de Mayo de 2017 de <https://static.thermoscientific.com/images/D01188~.pdf>.
- Secretaría Nacional de Planificación, SENPLADES. (2013). Plan Nacional para el Buen Vivir. Segunda. Recuperado el 20 de Octubre de 2016 de <http://www.buenvivir.gob.ec/objetivos-nacionales-para-el-buen-vivir>.
- Shawky, B. T. (1990). Ammonium-nitrogen assimilation and nitrogen fixation in azospirillum lipoferum and azospirillum brasilense. *Acta Biotechnologica*, 10(5), 411-417. doi:10.1002/abio.370100506

- Steenhoudt, Oda y Vanderleyden, Jos. (2000). Azospirillum, a free-living nitrogen-fixing bacterium closely associated with grasses: genetic, biochemical and ecological aspects. *FEMS Microbiology Reviews*, 24(4), 487-506. doi:10.1111/j.1574-6976.2000.tb00552.x
- Swedrzynska, D. y Sawicka, A. (2000). Effect of inoculation with Azospirillum brasilense on development and yielding of maize [*Zea mays* spp. *saccharata* L.] under different cultivation conditions. *Polish Journal of Environmental Studies*, 9(6), 505-509.
- Tilak, K. V. B. R. y Subba Rao, N. S. (1987). Association of Azospirillum brasilense with pearl millet (*Pennisetum americanum* (L.) Leeke). *Biology and Fertility of Soils*, 4(1), 97-102. doi:10.1007/BF00280358
- Vacheron, Jordan, Desbrosses, Guilhem, Bouffaud, Marie-Lara, Touraine, Bruno, Moënne-Loccoz, Yvan, Muller, Daniel, . . . Prigent-Combaret, Claire. (2013). Plant growth-promoting rhizobacteria and root system functioning. *Frontiers in Plant Science*, 4, 1-19. doi:10.3389/fpls.2013.00356
- Vallejo Garcia, Antonio, Ábalos Rodríguez, Diego, Téllez del Río, Ángela y Guardia, Guillermo. (2013). Fertilización y N₂O. Implicaciones en la huella de carbono. *Agricultura Revista Agropecuaria*, 966, 12-18.
- Zambrano, Jhon Alexander y Díaz, Lucía Ana. (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.

ANEXOS

Anexo 1: Medios de Cultivo

Anexo 1.1: Formulación del Agar Nutriente.

Componentes	Cantidades (g/L)
Pluripeptona	5
Extracto de Carne	3
Cloruro de Sodio	8
Agar	15
Ph	7.3 ± 0.2

Anexo 1.2: Formulación del medio Agar Rojo Congo.

Componentes Cantidad	(g/L)
Fosfato monobásico de Potasio	0.5
Sulfato de Magnesio Heptahidratado	0.2
Cloruro de Sodio	0.1
Extracto de levadura	0.5
Cloruro Férrico Hexahidratado	0.015
Ácido málico	5
Hidróxido de Potasio	4.8
Agar	20
pH final	7
Rojo Congo (autoclavado)	1:400

Anexo 1.3: Formulación del Medio DYGS.

Componentes	Cantidades (g/L)
Fosfato monobásico de Potasio Trihidratado	0.5
Sulfato de Magnesio Heptahidratado	0.5
Glucosa	2
Peptona	1.5
Extracto de levadura	2
Ácido glutámico	1.5
Ácido málico	2
pH final	6.8

Anexo 2: Análisis de Suelo.

Anexo 2.1: Análisis del suelo usado para la siembra de patrones, unidades expresadas en ppm.

Parámetros	Suelo, Rosas
pH (en H ₂ O)	7,0
C.E. (en mS/cm)	1,10
CIC (meq/100g)	15,0
% de Saturación de Bases	41% (Clasificación: moderado en bases, no saturado)
Distribución de las Bases en el % de Saturación	Ca: 17%, Mg: 8%, K: 12%, Na: 3%
Nitrato (NO ₃)	266
Amonio (NH ₄)	0,2
Fosfato (PO ₄)	34,1
Potasio (K)	126
Magnesio (Mg)	29,3
Calcio (Ca)	62,5
Sulfato (SO ₄)	106
Sodio (Na)	49,7
Cloruro (Cl)	32,7
Hierro (Fe)	0,180
Manganeso (Mn)	0,045
Cobre (Cu)	0,022
Zinc (Zn)	0,048
Boro (B)	0,300

