

**EVALUACIÓN DE BACTERIAS DIAZOTROFICAS (*Azotobacter sp* y
Azospirillum sp) EN LA RIZOSFERA DE CINCO FINCAS AFECTADAS POR
LOS PESTICIDAS UTILIZADOS PARA EL CULTIVO DE ALGODÓN EN
BOSCONIA CESAR**

AUTORES

**ERLAND DAVID CANTILLO MARTINEZ
LUISA FERNANDA HERNANDEZ ANDRADE**

DIRECTOR

**ALEX ABIB TROYA TOLOZA
MAGISTER EN BIOTECNOLOGIA**

**UNIVERSIDAD POPULAR DEL CESAR
FACULTAD DE INGENIERÍA Y TECNOLÓGICAS
PROGRAMA DE INGENIERÍA AMBIENTAL Y SANITARIA
VALLEDUPAR - CESAR**

2019

**EVALUACIÓN DE BACTERIAS DIAZOTROFICAS (*Azotobacter sp* y
Azospirillum sp) EN LA RIZOSFERA DE CINCO FINCAS AFECTADAS POR
LOS PESTICIDAS UTILIZADOS PARA EL CULTIVO DE ALGODÓN EN
BOSCONIA CESAR**

**Tesis de grado para optar el título de ingeniero ambiental y
sanitario**

de la Universidad Popular del Cesar.

AUTORES

ERLAND DAVID CANTILLO MARTINEZ

LUISA FERNANDA HERNANDEZ ANDRADE

**UNIVERSIDAD POPULAR DEL CESAR
FACULTAD DE INGENIERÍA Y TECNOLÓGICAS
PROGRAMA DE INGENIERÍA AMBIENTAL Y SANITARIA
VALLEDUPAR - CESAR**

2019

Nota De Aceptación:

Firma del presidente del jurado

Firma del Jurado

Firma del Jurado

Valledupar, julio de 2019

DEDICATORIA

Esta tesis esta dedicada a DIOS, ese padre que nos ha dado sabiduria, amor, inteligencia, el don de la paciencia que nunca nos ha dejado y nos ha fortalecido en cada momento.

A nuestras familias y padres por brindarnos su apoyo, concejos, compresión, amor, ayuda en los momentos dificiles, y por contar siempre con ellos durante el transcurrir de nuestros estudios.

Gracias tambien a nuestros queridos amigos y compañeros, quienes nos brindaron su apoyo y compañía en este proceso.

Luisa Hernandez A.

Erland Cantillo M.

AGRADECIMIENTOS

Nuestra profunda gratitud a nuestra institución universidad popular del cesar y a todo el cuerpo de docentes de la carrera de ingeniería ambiental y sanitaria, quienes nos formaron para ser los grandes profesionales que hoy somos, nos comprometemos en llevar en alto cada grano de sabiduría que depositaron en nosotros.

También agradecemos a la colaboración prestada por la universidad de cordoba, el grupo de investigación GRUBIODEQ, a la docente Mara Villalba y al Doctor Luis Oviedo.

Finalmente expresamos nuestro más sincero agradecimiento al Magister Alex Troya, principal colaborador y director de tesis, quien con su conocimiento nos guio durante el desarrollo de este proyecto.

TABLA DE CONTENIDO

1.	LISTA DE TABLA-----	8
2.	LISTA DE ANEXO-----	9
3.	INTRODUCCIÓN-----	10
4.	PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA-----	12
5.	JUSTIFICACIÓN-----	14
6.	OBJETIVOS-----	16
6.1.	OBJETIVO GENERAL:-----	16
6.2.	OBJETIVOS ESPECIFICOS:-----	16
7.	MARCO REFERENCIAL -----	17
7.1.	ANTECEDENTES -----	17
7.2.	MARCO TEÓRICO-----	19
7.3.	MARCO CONTEXTUAL -----	30
7.3.1.	Factores abióticos-----	30
7.3.2.	Factores bióticos -----	32
7.3.3.	Actividades predominantes-----	33
7.4.	MARCO CONCEPTUAL -----	35
7.5.	MARCO LEGAL -----	37
8.	HIPOTESIS -----	39
9.	METODOLOGÍA -----	40
9.1.	TIPO DE INVESTIGACION. -----	40
9.1.1.	Descriptiva (exploración descriptiva) -----	40
9.1.2.	LINEA DE INVESTIGACION: Sostenibilidad y gestión ambiental -----	40
9.1.3.	SUB-LINEA DE INVESTIGACION: Recurso Suelo -----	40
9.2.	POBLACIÓN -----	40
9.3.	MUESTRAS -----	40
9.4.	Desarrollo metodológico -----	41
9.4.1.	ETAPA 1. Obtención de la información técnica e instrumentos de recolección de la información. -----	41
9.4.2.	ETAPA 2. Toma de muestra de suelo por el método de cuarteo y zigzag	41

9.4.3.	ETAPA 3. Exploración microbiana -----	41
9.4.4.	ETAPA 4. Identificación microbiana-----	42
9.4.5.	ETAPA 5. Cuantificación de ácido indolacético por métodos colorimétricos. 42	
9.4.6.	Pruebas bioquímicas: -----	43
9.4.7.	ETAPA 6. Comparación de porcentaje de bacterias encontradas. -----	43
9.4.8.	ETAPA 7. Lugar de la investigación -----	44
10.	RESULTADOS Y ANALISIS-----	46
10.1.	Exploración de microorganismos-----	46
10.2.	Exploración microbiana -----	46
10.3.	Identificación de microorganismos -----	47
10.3.1.	Morfología de las colonias -----	48
10.3.2.	Morfología de las células-----	48
10.4.	Cuantificación de la producción de Ácido Indol Acético-----	50
10.4.1.	Preparación de la curva de calibrado: -----	50
10.4.2.	Preparación del AIA -----	54
10.4.3.	Pruebas Bioquímicas -----	57
10.5.	Comparación de las concentraciones. -----	59
10.6.	Lugar de investigación -----	60
11.	CONCLUSIÓN -----	61
12.	RECOMENDACIONES -----	63
13.	BIBLIOGRAFÍA -----	64
14.	ANEXOS. -----	70

1. LISTA DE TABLA

Tabla 1. Factores abióticos -----	31
Tabla 2. Nombres de las muestras.-----	47
Tabla 3. Observaciones macro y microscópicamente. Fuente autor. -----	49
Tabla 4. Datos de barrido. Fuente autor.-----	50
Tabla 5. Concentración Vs Absorbancia -----	53
Tabla 6. Datos de la absorbancia.-----	55
Tabla 7. Concentración para cada absorbancia. -----	57
Tabla 8. Pruebas bioquímicas. Fuente autor. -----	58
Tabla 9. Comparación de promedio de concentración entre cada finca. -----	59

2. LISTA DE ANEXO

Anexo A. Certificación práctica en la universidad de córdoba. -----	70
Anexo B. Resultado del pH. -----	71
Anexo C. Resultado de porcentaje de materia orgánica oxidable.-----	72
Anexo D. Resultado de carbono orgánico. -----	73
Anexo E. Resultado de nitrógeno total.-----	74
Anexo F. Resultado de porcentaje de humedad.-----	75
Anexo G. Consideraciones generales para interpretar los resultados químicos del suelo.76	
Anexo H. Tabla de interpretación. -----	77
Anexo I. Espectrofotómetro genesys 20.-----	78
Anexo J. Sustancias utilizadas para las pruebas bioquímicas.-----	78
Anexo K. Imágenes realizando diferentes procedimientos del proyecto de grado. 79	
Anexo L. Cronograma de actividades para el desarrollo del proyecto de investigación. -----	80
Anexo M. Tabla de presupuesto requerido para el desarrollo del proyecto de investigación. -----	81
Anexo N. Encuestas realizadas a los propietarios de las fincas. -----	82
Anexo O. Trabajo de campo de la investigación -----	86

3. INTRODUCCIÓN

Para muchos países los cultivos de algodón poseen gran importancia, ya que, no sólo proporciona fibras para la industria textil, sino que también juega un papel importante dentro de la industria alimenticia, pues sus semillas tienen un alto contenido en aceites y proteínas.

En Colombia existen alrededor de 297 productores de algodón, de los cuales 116 pertenecen a municipios de la costa, tales como: Cerete, Ciénaga de oro, Cotorra, Lorica, Montería, San Carlos y San Pelayo¹. Actualmente en el departamento del Cesar no se cultiva algodón, aunque existen estudios que buscan la reactivación del mismo².

En el departamento del Cesar, durante los años 90, surgió la bonanza de los cultivos de algodón, también conocido como el “oro blanco”, para suplir la demanda existente se deforestaron grandes hectáreas de bosque, se cultivaba de manera secuencial y se adicionaban agroquímicos (fertilizantes y plaguicidas) con el fin de acelerar los procesos, esto ocasiono la contaminación y desertificación de los suelos.

Aunque el uso de la mayoría de plaguicidas fue prohibido en Colombia desde 1986, debido a los efectos ocasionados sobre la salud humana y ambiental, el uso de fertilizantes ha persistido, estos ocasionan daños a la capa de ozono y a los mantos acuíferos³.

Hoy en día la economía del municipio está basada principalmente en actividades como la caza y la producción pecuaria, donde se incluye las actividades veterinarias, junto al comercio. Por otro lado el 22% del suelo en el municipio está destinado a la

¹ RESULTADOS Y ANÁLISIS COSTOS DE PRODUCCIÓN COSECHA COSTA 2016 – 2017 CONALGODON 30 de Junio del 2017

² Annelise Barriga Ramírez. Buscan ‘revivir’ el cultivo del algodón en el Cesar. EN EL TIEMPO (6 de diciembre del 2017)

³ Mariluz Hernández, Jhon V. Vidal y José L. Marrugo. Plaguicidas organoclorados en leche de bovinos suplementados con residuos de algodón en San Pedro, Colombia (29 de Noviembre del 2010)

producción agrícola, lo cual representa un total de 2.237 hectáreas de tierras, la segunda área más grande después de la ocupada por bosques, el municipio se categoriza de agropecuario.

Dentro de la producción pecuaria se caracteriza la ganadería tipo doble propósito (producción de carne y leche), donde la mayoría es extensiva⁴. Este tipo de práctica trae como consecuencia: pérdida de la biodiversidad y cobertura vegetal, compactación de los suelos, emisión de gases efecto invernadero, deforestación y explotación de los recursos.

La presente investigación posee como interés principal el aislamiento y evaluación de cepas nativas de los géneros *Azospirillum sp* y *Azotobacter sp*, debido a su potencial en la fijación de nitrógeno y producción de ácido indolacético; con el fin de demostrar su intervención en el desarrollo y crecimiento de la vegetación propia de cinco fincas ubicadas en el municipio de Bosconia.

⁴ PLAN DE DESARROLLO BOSCONIA-CESAR 2016-2019 (ENERO 2016) pag. 56.

4. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

“El departamento del Cesar es rico en recursos naturales y presenta una alta biodiversidad, pero sus extensiones de suelo han resultado drásticamente afectadas por las diferentes actividades que se les realizan, como la ganadería, la agricultura, la agroindustria y la minería”. Estas actividades, al no ser controladas, afectan de manera directa la relación biota-suelo, lo que desfavorece su recuperación⁵.

En Bosconia para la producción de algodón, durante los años 90, era común la utilización de fertilizantes, siendo el Metilparation el más aplicado. El uso de este fertilizante de manera excesiva e indiscriminada ocasiona serias afectaciones a la salud humana y ambiental, así como disminución de la biodiversidad y de la fijación de nitrógeno al suelo⁶.

El nitrógeno es un factor determinante para la fertilización en el cultivo de algodón, ya que aumenta su productividad y rentabilidad, sin embargo su porcentaje de absorción es en promedio 50%⁷. Una parte de los fertilizantes utilizados son absorbidos, mientras que la otra se pierde por volatilización, desnitrificación, lixiviación y erosión⁸.

Las sustancias liberadas al medio tras la utilización de estos agroquímicos generan problemas económicos, ambientales y sociales, que van desde la destrucción de la

⁵ CONTRALORIA MUNICIPAL DE VALLEUPAR. Oficina de control fiscal. RECURSO SUELO. (14 de enero del 2013) Pag. 40

⁶ Agencia para Sustancias Tóxicas y el Registro de Enfermedades (ATSDR). (6 de mayo del 2016)

⁷ Secretaria de agricultura, ganadería, desarrollo rural, pesca y alimentación.
<<https://www.gob.mx/sagarpa>>

⁸ Pedraza, R., Bellone, C., & de Bellone, C. (2010). Azospirillum inoculation and nitrogen fertilization effect on grain yield and on the diversity of endophytic bacteria in the phyllosphere of rice rainfed crop. European Journal of Soil Biology. (Pag. 36-43).

capa de ozono hasta la contaminación de aguas superficiales, pasando por la generación de enfermedades en los seres vivos⁹.¹⁰.

⁹ Confederación colombiana de algodón. "Resultados de la cosecha algodonera". Internet:
<http://conalgodon.com/estadisticas/#sc-tabs-1522112487513>

¹⁰ Gerardo Armando Aguado Santacruz. Introducción al Uso y Manejo de los Biofertilizantes en la Agricultura

5. JUSTIFICACIÓN

El municipio de Bosconia se caracteriza principalmente por poseer tierras altamente explotadas y degradadas debido al cultivo de algodón, es necesario el estudio de alternativas con el fin de recuperar la rizosfera, especialmente a través de investigaciones sobre biorremediación, ya que permite utilizar la biodiversidad microbiana como herramienta para mejorar ambientes dañados y preservar la salud de los ecosistemas.

Por lo anterior, es importante encontrar microorganismos capaces de nutrir el suelo mediante la fijación de nitrógeno, solubilización de minerales, regulación del crecimiento vegetal y estimulación del sistema de absorción¹¹; así como la producción de ácido indolacético, auxina que se encuentra en las plantas de forma natural, la cual promueve la producción de hormonas vegetales que regulan los procesos del desarrollo vegetal¹².

De igual forma, el tipo de articulación de esta investigación va ligada a la política del municipio el cual “planea realizar campañas de reforestación urbana, que logre mitigar los niveles de contaminación del aire y del suelo, y darle una apariencia más amable y armónica con el medio ambiente”¹³.

La motivación es demostrar que existen muchas alternativas naturales que pueden ser utilizadas para la regeneración del suelo, durante el desarrollo de esta investigación se evaluarán microorganismos nativos, capaces de ayudar a la regeneración vegetal y nutrición del suelo debido a su poder de fijación de nitrógeno.

Este proyecto de investigación concientizará a los propietarios de las fincas objeto de estudio, así como a pequeños y medianos productores acerca del impacto

¹¹ Hayat R, Ali S, Amara U, Khalid R, Ashamed I. Soil beneficial bacteria and their role in plant growth promotion: Annu Rev Microbiol. 2010. (Pag. 579-598).

¹² Castillo G, Altuna B, Michelena G, Sanchez J y Acosta M. Cuantificación del contenido de ácido indolacético (AIA) en un caldo de fermentación microbiana. Anales de Biología 27. 2005. (Pag. 137-142)

¹³ PLAN DE DESARROLLO BOSCONIA-CESAR 2016-2019 (ENERO 2016). Pag (105).

ambiental y social generado tras la utilización de agentes fertilizantes y plaguicidas en monocultivos extensivos, de manera puntual para el cultivo de algodón en el municipio de Bosconia, Cesar. Así mismo, pretende identificar cepas nativas microorganismos capaces de promover la rehabilitación vegetal, mediante la fijación de nitrógeno en el suelo y la producción de ácido indolacético, en los suelos afectados por el uso de los agentes anteriormente mencionados.

6. OBJETIVOS

6.1. OBJETIVO GENERAL:

Evaluar bacterias diazotróficas (*azotobacter sp* y *azospirillum sp*) en la rizosfera de cinco fincas afectadas por los pesticidas utilizados para el cultivo de algodón en bosconia cesar

6.2. OBJETIVOS ESPECIFICOS:

- Explorar microorganismos a nivel de género: *Azotobacter sp* y *Azospirillum sp*.
- Identificar microorganismos a nivel de género: *Azotobacter sp* y *Azospirillum sp*.
- Cuantificar la producción de Ácido Indol Acético en los microorganismos del género *Azotobacter* y *Azospirillum*
- Comparar los porcentajes de las bacterias diazotróficas arrojados en cada una de las fincas del presente estudio.

7. MARCO REFERENCIAL

7.1. ANTECEDENTES

Aislaron y caracterizaron 104 cepas de bacterias diazotróficas nativas de la rizosfera del cultivo de *Olea europea* “olivo” en Tacna, Perú. Las bacterias fueron caracterizadas en base a su capacidad promotora de crecimiento, mediante la producción de Ácido Indol Acético (AIA), solubilización de fosfatos, germinación de semillas de alfalfa y crecimiento en Medio Mineral sin Nitrógeno. Se seleccionaron las 20 mejores cepas según sus características bioquímicas y fisiológicas. Se encontraron correlaciones entre las poblaciones bacterianas con la materia orgánica, fósforo, pH del suelo, tipo de riego y profundidad de la raíz, observaron una mayor concentración de materia orgánica a mayor profundidad del suelo. **(Clavijo et al 2012)**

Se aislaron bacterias diazotróficas de los géneros *Azotobacter* y *Azospirillum* a partir de la rizosfera de cultivos de algodón en el Espinal, Tolima. Las poblaciones microbianas se caracterizaron fenotípicamente en los medios de cultivo semiespecíficos: Ashby y LG (*Azotobacter sp*) y NFb, LGI y Batata (*Azospirillum sp*). La promoción de crecimiento vegetal se determinó mediante la actividad de la enzima nitrogenasa por medio de la técnica de reducción de acetileno y producción de índoles por el método colorimétrico de Salkowsky. La caracterización fenotípica y bioquímica de los aislamientos obtenidos permitió seleccionar 5 cepas eficientes en la promoción de crecimiento vegetal in vitro, mediante las actividades de reducción de acetileno y producción de compuestos indólicos, con valores comparables con cepas de referencia internacional. **(Guzmán et al 2012)**

Abordaron las potencialidades de las bacterias diazotróficas asociativas en la promoción del crecimiento vegetal y el control de *Pyricularia oryzae* (Sacc.) en el cultivo del arroz (*Oryza sativa* L.), presentando estos microorganismos como una alternativa de biofertilización, ya que pueden mitigar los efectos nocivos ocasionados por *P. oryzae* en *O. sativa*. La selección de cepas autóctonas permitió el éxito de los inoculantes bacterianos, los cuales promovieron la adquisición de nutrientes, la fijación de nitrógeno, la solubilidad de fosfatos y la producción de fitohormonas.

(Hernández et al 2014)

Determinó el efecto de diez cultivos de *Azospirillum spp.*, nativas en el desarrollo vegetativo de *Zea mays* L. "maíz", en condiciones de invernadero. Las bacterias previamente aisladas en la rizosfera de maíz, se cultivaron en caldo nutritivo por 24 horas y con el sobrenadante se obtuvo el inóculo estandarizado a 9×10^8 cel/mL⁻¹, que se sembró en caldo extracto de suelo 10%, caldo tripticasa soya suplementado con triptófano y caldo Sundara Rao y Sinha Medium. Se demostró la fijación de nitrógeno, producción de ácido indolacético y solubilización de fósforo. Se incrementó el desarrollo vegetativo en condiciones de invernadero, observándose aumento en la altura, biomasa aérea, precocidad en la floración e incremento en la biomasa radicular.

(Córdova et al 2015)

7.2. MARCO TEÓRICO

La utilización de microorganismo de vida libre que fijan nitrógeno y secreten hormonas son fundamentales en el desarrollo agroecológico de muchos cultivos como caña de azúcar, arroz, sorgo, y pastos tropicales, dentro el género más estudiado se encuentra *Azospirillum sp*, *Azotobacter sp*, *Beijerinckia sp* y *Klebsiella sp*, (Döbereiner *et al.*, 1995). Estos microorganismos son consideradas bacterias promotoras del crecimiento vegetal (BPCV), debido a su capacidad para estimular directamente el crecimiento de las plantas, a través de diversos mecanismos, como el aporte de nitrógeno por el proceso de fijación biológica de nitrógeno atmosférico (Boonjawat *et al.*, 1991; Elmerich *et al.*, 1992; Döbereiner *et al.*, 1995), producción de sustancias reguladoras del crecimiento (Arshad y Frankenberger, 1998), solubilización de minerales y nutrimentos (Crowley *et al.*, 1991), incremento en el volumen de la raíz (Bowen y Rovira, 1999), inducción de resistencia sistémica a patógenos (Van Peer *et al.*, 1991), inhibición del crecimiento de organismos antagonicos (Utkhede *et al.*, 1999) e interacción sinérgica con otros microorganismos del suelo (Bashan *et al.*, 1996b).

Generalidades de *Azospirillum sp*

La bacteria fue aislada por primera vez en Dinamarca, a partir de suelos arenosos pobres en N₂ (Beijerinck, 1959); inicialmente fue denominada con el nombre de *Spirillum lipoferum* (Beinjerinck, 1925). Döbereiner y Day, (1976) fueron los primeros autores en reportar su amplia distribución en la rizósfera de varios pastos tropicales, silvestres y cultivados, en cereales y leguminosas de suelos tropicales, subtropicales y templados de todo el mundo. Estos microorganismos pueden encontrarse en la rizósfera o en la rizósfera. (Fallik *et al.*, 1988; De Troch y Vanderleyden, 1996), se caracterizan por adherirse a la superficie de raíz (Castellanos, 1998) y no formar nódulos, sus células se encuentran en forma de bastón curvo, Gram negativa, tienen respuesta oxidasa positiva y catalasa usualmente positiva.

Es una bacteria de vida libre capaz de fijar N₂ atmosférico, transformándolo en formas asimilables para las plantas; también produce hormonas como la auxina Ácido Indolacético (AIA), que estimula la ramificación de las raíces y el desarrollo de pelos radiculares (33-40%). Se ha sugerido, además, que este microorganismo está involucrado en una mejor absorción de minerales y agua por parte de la planta lo que contribuye al crecimiento y aumento del rendimiento de los cultivos (Kapulnik et al., 1981; Khammas et al., 1989; Bashan y Holguin, 1997 b).

Este género, muestra una distribución geográfica amplia alrededor del mundo, siendo más abundante en las regiones tropicales, aunque también se encuentra en regiones templadas, frías y desérticas (De Conick et al., 1988). El pH del suelo juega un papel importante en la presencia de las especies, como por ejemplo *A. lipoferum* y *A. brasilense* que son abundantes en suelo con valores de cercanos a la neutralidad. El porcentaje de arcilla, contenido de materia orgánica, la capacidad de retención de agua y el contenido de nitrógeno afectan positivamente la sobrevivencia de *A. brasilense*. Sin embargo, el microorganismo es independiente de la aridez del suelo (Bashan et al., 1995).

Las bacterias del género *Azospirillum sp* tienen un metabolismo carbonado y nitrogenado muy versátil, lo que le permite adaptarse y establecerse en el competitivo entorno rizosférico. Como fuentes nitrogenadas, este género puede utilizar un amplio rango de sustratos, amonio, nitrato, nitritos, aminoácidos y nitrógeno molecular. En condiciones desfavorable, tales como la desecación y carencia de nutrientes, puede enquistarse, recubriéndose de una capa de polisacáridos produciendo una acumulación de gránulos de β- hidroxibutirato, que sirve a la bacteria de reserva de fuente carbonada (Collado, 2006)

El aislamiento de *Azospirillum sp* a partir de raíces de numerosas plantas silvestres y cultivadas en diferentes tipos de suelo, ha sido reportado en todo el mundo, sin embargo, han sido caracterizado seis especies: *A. brasilense*, *A. lipoferum*, *A. amazonense*, *A. halopraeferans*, *A. irakense* (Holt et al., 1994) y *A. largimobile*; la

especie *A. brasilense* ha sido la en la actualidad la mejor caracterizada genéticamente (caballero –Mellado 2002).

Esta bacteria denominada BPCV pueden ser de vida libre o asociadas, aerobias, anaerobias o anaerobias facultativas (Rodríguez, 1995). Las BPCV se han aislado en suelos donde predomina la vegetación de gramíneas, como pastos tropicales (Döbereiner y Day, 1975), pastos de zonas templadas (Kole et al., 1988), pastos de suelos salinos (Quesada et al., 1982; Bagwell et al., 1998) y pastizales de zonas áridas (Herman et al., 1993, 1994), así como de gramíneas cultivadas. Las principales especies bacterianas asociadas con gramíneas son *Azospirillum lipoferum*, *A. brasilense* y *A. amazonense* (Döbereiner et al., 1995); *Herbaspirillum seropedicae* y *Acetobacter diazotrophicus* (Döbereiner y Day, 1975); *Enterobacter agglomerans*, *E. cloacae*, *Bacillus azotofixans*, *B. polymyxa* y *Alcaligenes faecalis* (Boonjawat et al., 1991), *Klebsiella sp.* (Boonjawat et al., 1991; Palus et al., 1996) y bacterias de los géneros *Azotobacter sp* y *Pseudomonas sp* (Bagwell et al., 1998).

Generalidades de *Azotobacter sp*

El género *Azotobacter* fue descubierto por Beijerinck en 1901 y desde entonces se ha desplegado un enorme interés en estudiar estos microorganismos debido a la contribución que pueden hacer a la nutrición nitrogenada de las plantas superiores (Brown et al., 1962). Es uno de los primeros géneros conocidos como fijadores asociativos de nitrógeno, siendo el más estudiado en el ámbito mundial a juicio de Martínez y Dibut (1996).

Su nombre proviene de la palabra francesa “asoto” que significa nitrógeno y del griego “bacter” que significa bacilo (Hernández et al., 1994) y según esos autores son microorganismos de vida libre de suelo que requieren de sustancias orgánicas como fuente de energía, pero si hay abundancia de NO_3^- y NH_4^+ , lo emplean con facilidad y no fijan nitrógeno. Para fijar nitrógeno requieren molibdeno que puede ser parcialmente reemplazado por vanadio.

La población de *Azotobacter sp* comprende siete especies: *A. chroococcum*, *A. vinelandii*, *A. beijerinckii*, *A. paspañi*, *A. armeniacus*, *A. nigricans*, *A. salinetris*. Los miembros de la familia *Azotobacteraceae* tienen la capacidad de sintetizar antibióticos y generar sustancias promotoras del crecimiento vegetal (Pandey y Kumar, 1990), además de fijar nitrógeno no simbióticamente. Especies como *A. chroococcum*, *A. vinelandii*, son utilizadas como bioinoculantes en suelos tropicales alcalinos.

Los microorganismos de este género comprenden bacterias con formas bacilar, son Gram negativas, en cultivos viejos como gran variables, las células son ovoides y miden aproximadamente 2 µm a 4 µm de diámetro, siendo las de mayor tamaño *A. chroococcum* que llegan a medir hasta 6 µm; pueden llegar a formar cadenas de tamaños variables, la forma de resistencia es el quiste, son aerobias, pero algunos pueden vivir en concentraciones bajas de oxígeno y su movilidad se debe a flagelos peritricos, además, producen pigmentos solubles en agua en medio específicos (Saribay, 2003).

Bioquímicamente son catalasa y oxidasa positivas, reducen el nitrato, producen el sulfuro de hidrógeno e hidrolizan almidón, producen sustancias promotoras de crecimiento como giberelinas, auxinas y citoquininas (Santana et al., 2002); las bacterias de este género fijan asimbióticamente nitrógeno y son solubilizadores de fosfato, además realizan el proceso de biodegradación de plaguicidas como el endosulfan (Castillo et al., 2005). Cabe agregar que estos microorganismos, fijan al menos 10 mg de N₂ por gramo de carbohidratos consumido (Holt, 2000).

***Azotobacter sp* en el suelo**

La población de *Azotobacter sp* es principalmente influenciada por otros microorganismos presentes en el suelo, existen algunos microorganismos que estimulan el aumento de *Azotobacter sp*, lo cual incrementa la fijación de nitrógeno. Sin embargo, hay otros que limitan la población de estas bacterias y obstaculizan la fijación efectiva del nitrógeno, por consiguiente, no pueden lograr la multiplicación

en el suelo. La propagación de estas bacterias está relacionada con la presencia en el medio de suficientes cantidades de fósforo (P) y potasio (K), siendo mayor el efecto del fosforo, cuya escasez o ausencia puede inhibir el desarrollo del cultivo, este elemento estimula el metabolismo del carbono, la multiplicación y la fijación de nitrógeno. Caso contrario pasa con el potasio, ya que si existen altas concentraciones de este elemento en el suelo se inhibe el desarrollo de las bacterias fijadoras (Lozada 2010).

Fijación biológica de nitrógeno

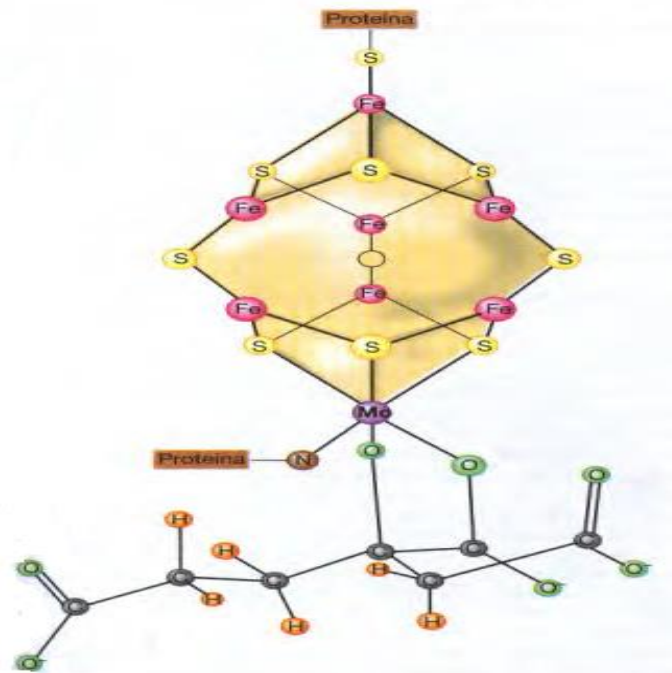
Es el proceso en el que el nitrógeno atmosférico es reducido a amonio, el cual es la forma asimilable para los organismos vivos, utilizada en la síntesis de biomoléculas (Cheng, 2008).

El proceso de reducción se realiza por el complejo enzimático nitrogenasa, que consta de dos proteínas distintas llamadas dinitrogenasa y dinitrogenasa reductasa, ambos componentes contienen hierro y la dinitrogenasa contiene además molibdeno. En la dinitrogenasa el hierro y el molibdeno forman parte de un cofactor conocido como FeMo-co (figura 1), que es el centro donde se produce la reducción del N_2 . La composición del hierro FeMo-co es $MoFeS_8$ homocitrato (figura 1), y se presentan dos copias de FeMo-co por molécula de dinitrogenasa. (Madiga et al., 2003).

Esta reducción de nitrógeno requiere mucha energía, alrededor de 12 a 16 moléculas de ATP por cada molécula de nitrógeno fijada (Ecuación 1) Betancour, 2002; Singleton, 2004; Baca et al., (2000). Para la fijación bacteriana de nitrógeno se necesita un aporte importante de energía (150 kcal/mol) en forma de ATP y coenzimas reducidas; la energía puede obtenerse a través de la conversión de la energía lumínica que realizan los organismos fotoautótrofos, como las cianobacterias, o a través de la respiración de los heterótrofos como *Azotobacter sp* (Atlas & Bartha, 2002). Ya que la fijación de nitrógeno en bacterias aeróbicas como

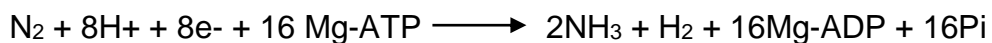
Azotobacter es un proceso que demanda gran cantidad de energía, requiere una eficiente fosforilación oxidativa.

Figura 1. Estructura de FeMo-Co, el cofactor con hierro y molibdeno de la nitrogenasa.



Fuente: Madigan, 2003.

Ecuación 1. Reacción en la fijación de nitrógeno. Fuente *Baca et al., (2000)*.



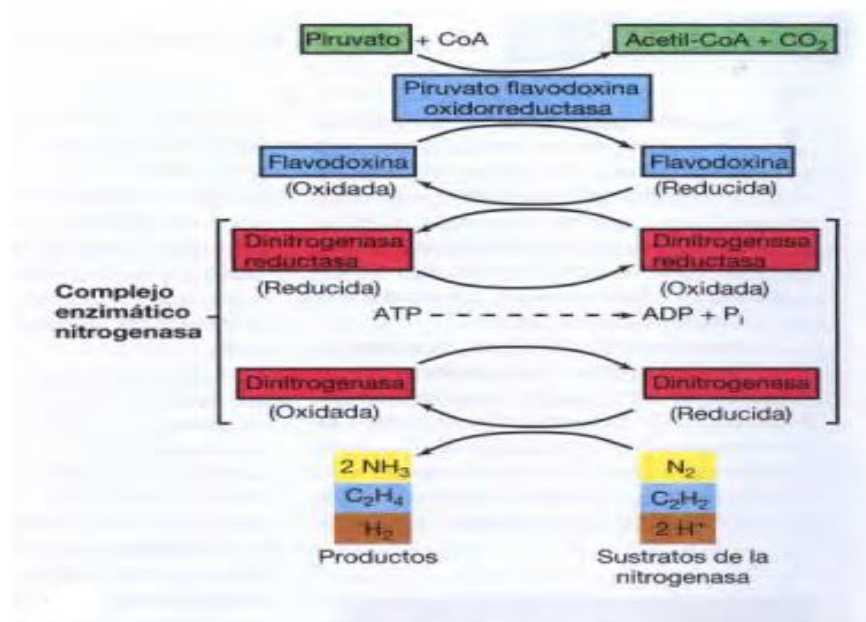
Flujo de electrones en la fijación de nitrógeno

La secuencia de transferencia de electrones en la nitrogenasa es la siguiente: donador de electrones \rightarrow reductasa de dinitrogenasa \rightarrow dinitrogenasa \rightarrow N_2 .

Los electrones para la reducción del nitrógeno se transfieren a la nitrogenasa reductasa desde la ferredoxina o la flavodoxina, proteína de bajo potencial que contiene hierro y azufre. En *Clostridium pasteurianum* el donador de electrones es la ferredoxina, que se reduce por la ruptura fosforoclastica del piruvato acetil-CoA +

CO₂. Además de la ferredoxina reducida, para la fijación de N₂ se necesita ATP. En cada ciclo de transferencia de electrones, la dinitrogenasa reductasa es reducida por ferredoxina/ flavodoxina y se une a dos moléculas de ATP. El enlace de ATP altera la conformación de la reductasa dinitrogenasa y disminuye su potencial reductor permitiendo la interacción con la dinitrogenasa. En la transferencia de electrones a la dinitrogenasa, el ATP es hidrolizado y la dinitrogenasa reductasa se disocia de la dinitrogenasa y empieza otro ciclo de reducción y de enlace con ATP. (Figura 2). Cuando se ha reducido adecuadamente, la dinitrogenasa reduce a continuación el N₂ a 2NH₃ y la reducción afectiva ocurre en el FeMo-co.

Figura 2. Función de la nitrogenasa. (a) Pasos de la fijación de N₂ empezando por el piruvato. Los electrones son aportados desde la dinitrogenasa, de uno en y cada electrón se asocia con la hidrólisis de 2-3 ATPs.



Fuente: Madigan, 2003.

Aplicaciones de *Azotobacter sp* y *Azospirillum sp* en la agricultura

Los resultados han sido significativos en varios parámetros de crecimiento, los cuales en numerosos casos aumentan el rendimiento del cultivo desde un 5% hasta un 30%, cuando reemplazan fertilizantes con alto porcentaje de nitrógeno (Okon y

Labandera, 1994). En la Universidad Autónoma de Puebla se inocularon grandes extensiones de suelos agrícolas cultivados con maíz y trigo con diferentes cepas de *Azospirillum sp* obteniéndose incrementos significativos en el rendimiento de la cosecha de ambos granos.

Los estudios demostraron que la inoculación en la gramínea *Triticum aestivum L.* con una cepa de *Azospirillum brasilense*, aislada de la rizósfera de *Brachiaria mutica*, mostró mejores resultados que la inoculación con cepas de colecciones aisladas de otras partes del mundo (Okon y Labandera, 1994).

Otro estudio demostró que la respuesta de inoculaciones de *Azospirillum sp* es influenciada por fertilizantes a base de N, P y K, ya que estos incrementan la población de esta bacteria, lo cual repercute en una mayor producción de biomasa en las plantas (Kapulnik et al., 1981; Negi et al., 1991; Nahidh y Hakeem, 1991).

En experimentos de campo la inoculación con *Azospirillum sp* ha promovido el crecimiento de plantas de importancia agronómica en un 10-20 % (Okon, 1985; Summer, 1990; citados por Zaady y Perevolotsky, 1995). Según Okon y Kapulnik (1986) (citados por Zaady y Perevolotsky, 1995).

La inoculación con *Azospirillum sp* incrementa la producción de materia seca, sin embargo, este efecto puede ser benéfico en algunos casos o no significativo en otros (Saito y Graciolli, 1981).

Según Motsara et al. (1995) en cultivos como arroz, maíz, trigo y caña de azúcar, *Azospirillum sp* puede incrementar el rendimiento entre el 15 y el 30 %.

En Cuba se han utilizado biofertilizantes a base de esta bacteria que permiten la sustitución del 25% del fertilizante nitrogenado en arroz e incrementan el rendimiento entre el 5 y el 15%. En caña de azúcar la aplicación de biopreparados a base de *Azospirillum sp* ha producido incrementos en los rendimientos que varían entre el 17 y el 50%, esto ha permitido ahorrar entre 50 y 100% del fertilizante nitrogenado (The Latin American Alliance, 1997).

Torres et al., (2000) aislaron 18 cepas del Género *Azotobacter sp* de 20 cultivos de arroz en Tolima (Colombia), las cuales produjeron importantes concentraciones de ácido indol acético (AIA), incluyendo *A. vinelandi* con 32,22 ppm y *A. chroococcum* con 30,7 ppm de AIA. Por otro lado, Aquilanti et al., (2004), aislaron bacteria diazotróficas asimbióticas de la rizosfera de cultivos de maíz, trigo y hortalizas en Italia, los géneros encontrados fueron de la familia Azotobacteraceae, al igual que miembros de los géneros *Beijerinckia sp*, *Azomonas sp* y *Agrobacterium sp*. Tejera et al., (2005), aislaron cepas de *A. Chroococcum* y *Azospirillum sp*. De la rizósfera de cultivos de caña de azúcar en Granada España, Utilizando medio libre de Nitrógeno (Burk' s) (Martínez et al. 1985).

Neeru et al., (1991), utilizaron *A. Chroococcum* como bioinoculantes en la India para una variedad de cereales, oleaginosas y vegetales obteniendo resultados favorables en el peso seco de la planta y la producción del grano. Igualmente, Galindo et al., (2006), inocularon bacterias diazótrofes (*A. vinelandii*) y solubilizadores de fosfato en plántulas de mangle y plantas de *Citrullus vulgaris* en la isla de San Andres (Colombia) incrementando la altura de las plantas, el número de hojas y nudos. Los bioinoculantes en Colombia también se ha utilizado el cultivo de crisantemo (Santana et al., 2002), pompón y clavel (FUNDASES, 2007).

Está documentando que bacterias del genero *Azotobacter sp* y *Azospirillum sp* han sido utilizados en acuicultura y en la producción de vermicompost para aumentar el contenido de nitrógeno y fósforo del producto (Garg et al., 2001; Kumar & Singh, 2001).

Entre las bacterias diazótrofes asimbióticas utilizada como biofertilizante una de las más utilizada es *Azotobacter sp*; La importancia agronómica radica especialmente en la capacidad producir antibióticos, sustancias estimulantes del crecimiento vegetal (SPCV) del tipo auxinas, giberelinas y citoquininas (Pandey et al, 1998) aminoácidos y otras moléculas con actividad biológica de interés industrial y Comercial como polisacáridos (Sabra et al., 2001; Cuesta et al.,2006).

La inoculación con cepas de *Azospirillum sp* seleccionadas permite reducir hasta en 50% el uso de los fertilizantes minerales (N, P, K) sin que disminuya el rendimiento del cultivo, e incluso se obtiene 5-10% de aumento respecto a los cultivos fertilizados con el 100% del fertilizante mineral. (Caballero-Mellado 2007)

La aplicación de *Azospirillum lipoferum* a cultivos de tomate mostraron disminución en el consumo de fertilizante nitrogenado en un 30 %, lográndose rendimientos satisfactorios y contribuyendo de esta forma a minimizar las afectaciones al ambiente (Terry, 1998); un efecto positivo sobre el crecimiento de las plántulas, así como en el estado nutricional del cultivo de tomate con un rendimiento agrícola superior a un 11 % con respecto a las plantas testigo y un alto nivel poblacional en la rizosfera de las plantas inoculadas, se encontró en las experiencias de Terry *et al.*, (2005).

Estudios realizados utilizando *Azotobacter chroococcum* sobre cultivos de Sorgo (*Pennisetum glaucum* (L)R. Br) denotaron incrementos significativos de un 4,9 a 5,4 % en la producción del grano con respecto al control (Singh *et al.*, 2003); igualmente se encontró buenos rendimientos en los cultivos de maíz con disminución en la utilización de fertilización química utilizando la misma especie bacteriana (Wu *et al.*, 2005).

La inoculación de bacterias *Azotobacter chroococcum* y *Azotobacter brasilense* a cultivos de trigo incrementó notablemente el crecimiento en las plantas y en la productividad (Mohsen *et al.*, 2004); disminución en la fertilización nitrogenada sobre cultivos de trigo y cebada fueron los hallazgos obtenidos por (Sayeda *et al.*, 2005) utilizando los mismos géneros bacterianos.

Las respuestas positivas obtenidas en las investigaciones realizadas con microorganismos de los géneros *Azotobacter sp* y *Azospirillum sp* han sido atribuidos a la capacidad de fijar nitrógeno atmosférico en forma asimbiótica y a la capacidad secretora de sustancias promotoras del crecimiento vegetal (auxinas) que estimulan los rendimientos en las cosechas (Dobbelaere *et al.*, 2003). Estos microorganismos presentan un gran potencial para la agricultura sostenible por su

efectividad que les permiten aumentar el rendimiento de los cultivos, acortar ciclos, disminuir el uso desmedido de fertilizantes minerales y productos químicos y, por consiguiente, reducir la contaminación ambiental.

El instituto Colombiano Agropecuario (ICA) mediante resolución 00375 define bioinoculantes como aquel producto elaborado con base a una cepas de microorganismos benéficos que al aplicarse al suelo o a las semillas, promueven el crecimiento vegetal o favorece el aprovechamientos de los nutrientes en asociación con la planta o su rizosfera (ICA, 2004), su uso favorece a procesos limpios y rápido de origen microbiano, están elaborados de diferentes grupos de microorganismo: bacterias, hongos, algas (Garzón et al.,2001).

Tal como cita Bellone y Carrillo de Bellone (2001) *Azospirillum brasiliense* es una rizobacteria fijadora del nitrógeno que promueve el crecimiento cuando es inoculada especialmente en gramíneas.

También Jaime *et al.* (1999) concluyeron que las inoculaciones con diferentes cepas libres fijadoras de nitrógeno lograban incrementos en el cultivo de maíz, en especial con *Azospirillum sp.*

Azospirillum sp estimula la densidad y longitud de los pelos capilares, la velocidad de aparición de las raíces laterales y la superficie radical. La intensidad de estos efectos en la morfología radical, depende de la especie vegetal y el cultivar y de la concentración del inóculo de *Azospirillum sp* (Frioni 1999).

Según los resultados obtenidos por Ortega (1999) cabe esperar una nitrificación del amonio producido en el tratamiento con inoculante y que este nitrógeno quede disponible para un próximo cultivo.

Los resultados obtenidos por Rodríguez Cáceres *et al.* (1996) mostraron que la respuesta a la inoculación varía en función del grado de fertilidad y la disponibilidad del agua de los suelos, observando la gran importancia que puede adquirir la relación cepa – cultivo.

7.3. MARCO CONTEXTUAL

Municipio de Bosconia, Cesar.

El municipio de Bosconia, está localizado en la parte noroccidental del departamento del Cesar, limitando al norte con el municipio de El Copey, al oriente con jurisdicción de la ciudad de Valledupar, al sur con el municipio de El Paso y al occidente con el departamento del Magdalena separado de este por el río Ariguaní.

El área total del municipio es de 609 km². La cabecera municipal está localizada en el centro del municipio. Su población es de 38.634 habitantes. La temperatura promedio es de 32° C y tiene dos estaciones lluviosas intercaladas por estaciones secas. Es por demás el municipio más caliente del departamento del Cesar¹⁴.

El Municipio cuenta con un canal denominado CANAL GARCES, pero comúnmente conocido como EL TROPEZON, se encuentra ubicado a 7 Km de la Cabecera Municipal en la vía Bosconia - Plato. Además, se cuenta con una pequeña fuente de agua subterránea denominada el Manantial y está ubicada a 1 Km de la Cabecera Municipal en la Vía Bosconia - Valledupar.

7.3.1. Factores abióticos

El municipio de Bosconia cuenta con un clima cálido seco es isotérmico y cuenta con temperaturas que pueden alcanzar valores promedios de 32° hasta los 42° grados centígrados, La humedad relativa en la zona presenta un valor promedio mensual de 53%, datos estimados en la estación meteorológica de palmeras de la costa.

El brillo solar presenta los valores mayores en las partes bajas, en tanto que en las partes medias y altas las horas de insolación disminuyen debido al incremento de la nubosidad y los obstáculos orográficos; El régimen pluviométrico en toda la región es de tipo bimodal, con la ocurrencia de dos periodos de lluvias mayores

¹⁴ Sitio web del municipio de Bosconia-Cesar <<http://www.bosconia-cesar.gov.co> >

intercaladas con dos menores. La precipitación media mensual es de 88.33 mm de lluvia.

Entre los Indicadores de suelo, se encuentran los siguientes datos:

Tabla 1. Factores abióticos

Espesor del suelo rocas sedimentarias	3000-5000 mts y en llanuras aluviales alcanza hasta los 100 mts.
Pendiente edáfica general	El municipio presenta un relieve plano con pendiente de 3 a 5%
Textura	Los suelos se caracterizan por ser de baja a mediana evolución predominado los de baja a mediana evolución, drenaje buenos a imperfectos, fertilidad muy baja a moderada, limitados por sales de sodio, piedra y horizonte argólico ocupando el 56% del municipio.
Permeabilidad	Los suelos se caracterizan por poseer un drenaje bueno a imperfecto
Nivel freático	0.995 m a 4.38 m
Humedad	Media terrenos arcillosos
Ph	Moderado

Fuente: PGIRS del municipio de Bosconia cesar.

7.3.2. Factores bióticos

Flora

La zona de vida en la que se encuentra inmersa la cobertura vegetal presente en el municipio de Bosconia corresponde al Bosque seco tropical, zona definida según Espinel & Montenegro (1977) como aquella formación vegetal, distribuida entre los 0 a 1000 m de altitud, con temperaturas superiores a los 24°C y precipitaciones entre los 700 y los 2000 mm anuales, con uno o dos periodos de sequía marcados al año.

En el área se presentan unidades de cobertura vegetal de origen natural como el bosque abierto y la Vegetación secundaria, las cuales constituyen el hábitat de la mayor diversidad de especies de flora y fauna de la zona.

Por otra parte, en el área de Influencia del Municipio de Bosconia se presentan cuatro especies con categoría de amenaza a nivel nacional, las cuales corresponden a:

Carreto *Aspidosperma polyneuron* – Apocynaceae (En Peligro)

Guayacán de Bola *Bulnesia arborea* - Zygophyllaceae (En peligro)

Ceiba toluá *Pachira quinata* - Bombacaceae (En peligro)

Bálsamo *Myroxylon balsamum* – Fabaceae (Casi Amenazada).

Fauna

Se encuentran ocho hábitats para fauna, ubicados en 13 tipos de coberturas con un área total de 849,05 ha. Esto indica que la fauna emplea el 65,81% de las coberturas identificadas dentro del perímetro del municipio. En relación con la avifauna fueron registradas un total de 119 especies, de las cuales 117 están distribuidas en 18 órdenes, 37 familias y 89 géneros. Las familias mejor representadas son Tyrannidae (atrapamoscas) con 21 especies, Accipitridae (águilas y gavilanes), Furnariidae

(rastrojeros), Icteridae y Ardeidae (garzas). Con respecto al grupo de mamíferos se registraron 31 especies agrupadas en 15 Familias y siete Órdenes.

7.3.3. Actividades predominantes

Las principales actividades económicas son comercio, ganadería (carne y leche), agricultura (con cultivos de palma africana, arroz, maíz y ajonjolí), industria.

Imagen 1. Municipio de Bosconia



(Fuente: Google Maps, 2017)

Imagen 2. Ubicación del municipio de Bosconia, con respecto al departamento del Cesar.



(Fuente: Alcaldía municipal de Bosconia, 2017)

7.4. MARCO CONCEPTUAL

ABSORCIÓN: proceso de penetración de una sustancia dentro de un cuerpo poroso o permeable de otra sustancia o de un tejido.

ACONDICIONADOR DEL SUELO: cualquier material añadido a un suelo con el propósito de mejorar sus condiciones físicas y químicas.

ADAPTACIÓN: proceso por el que un organismo se acomoda al medio ambiente y a sus cambios.

AGRICULTURA: labranza o cultivo de la tierra. Arte de producir alimentos a la tierra mediante la acción del hombre.

AGRICULTURA EXTENSIVA: forma de cultivo que requiere de grandes extensiones de tierra, con importantes insumos para fertilizar el suelo y para la protección de las cosechas, en particular cuando se trata de un monocultivo.

BACTERIA: organismo unicelular y microscópico, procariótico, carente de clorofila.

BIOMASA: expresión ponderal de los organismos existentes en cualquier espacio definido.

CONTAMINACIÓN: alteración de un hábitat por la incorporación de sustancias extrañas capaces de hacerlo menos favorable para los seres vivos que lo pueblan.

DESERTIFICACIÓN: acción de degradar el ecosistema transformándolo en un desierto, provocada por la actividad de los seres humanos.

FERTILIZANTE: composición nutritiva, orgánica o inorgánica, para mejorar el crecimiento de las plantas.

FIJACIÓN DE NITRÓGENO: proceso que llevan a cabo algunos microorganismos procariotas, dándoles la habilidad de no depender de otras especies para la captación y asimilación del nitrógeno.

MONOCULTIVO: cultivo de grandes áreas de terreno con una sola especie vegetal.

NUTRIENTE: sustancia que contiene alimento. Elementos el suelo y el agua que las plantas y animales toman.

PLAGUICIDA: termino general aplicado a un grupo de sustancias químicas usadas para el control o exterminio de plagas como insectos, hongos, bacterias y otros, en general depredadores de los productos agrícolas o parásitos del hombre.

RIZOSFERA: región del suelo cuya actividad biológica es influenciada por las raíces de las plantas, aquí los exudados de las raíces afectan los procesos del suelo y los microorganismos que se encuentran en él. Se caracteriza por el aumento de la biomasa microbiana y de su actividad.

SUELO: se entiende por suelo la superficie de territorio nacional que puede ser utilizada para fines de producción agropecuaria, mineral o forestal.

USO DEL SUELO: disponibilidad del suelo para una seria de posibles usos, que pueden ser ordenados y distribuidos de acuerdo a un plan, o de manera espontánea.

7.5. MARCO LEGAL

TIPO	ASPECTO	DESCRIPCIÓN
LEY	Seguro ecológico.	LEY 491 DE 1999, Por el cual se establece el seguro ecológico, se modifica el Código Penal y se dictan otras disposiciones.
DECRETOS	Código de los recursos naturales renovables y de protección del medio ambiente.	DECRETO 2811 DEL 18 DE DICIEMBRE DE 1974. Por el cual se dicta el Código Nacional de Recursos Naturales Renovables y de Protección al Medio Ambiente.
	Manejo integrado de los recursos	DECRETO 1974 DE 1989. Por el cual se reglamenta el artículo 310 del Decreto-ley 2811 de 1974 sobre Distritos de Manejo

	naturales renovables.	Integrado de los Recursos Naturales Renovables y la Ley 23 de 1973.
	Uso y manejo de plaguicidas.	DECRETO 0775 DE 1990. Por el cual se reglamentan parcialmente los Títulos III, V, VI, VII y XI de la Ley 09 de 1979, sobre uso y manejo de plaguicidas.
	Objeto del control y vigilancia epidemiológica.	DECRETO 1843 DE 1991. Por el cual se reglamentan parcialmente los títulos III, V, VI, VII y XI de la ley 09 de 1979, sobre uso y manejo de plaguicidas.
RESOLUCIÓN	Suelos.	RESOLUCIÓN 0170 DE 2009. Por la cual se declara en Colombia el año 2009 como año de los suelos y el 17 de junio como Día Nacional de los Suelos y se adoptan medidas para la conservación y protección de los suelos en el Territorio nacional.

8. HIPOTESIS

¿Podrá una bacteria del género *Azotobacter sp* y *Azospirillum sp* mejorar las condiciones del suelo en cinco fincas del municipio de Bosconia, Cesar; mediante la producción de ácido indoloacético e ion amonio?

9. METODOLOGÍA

9.1. TIPO DE INVESTIGACION.

El tipo de investigación aplicada para la evaluación de bacterias diazotróficas (azotobacter sp y azospirillum sp) en la rizosfera de cinco fincas afectadas por los pesticidas utilizados para el cultivo de algodón en Bosconia Cesar es:

9.1.1. Descriptiva (exploración descriptiva)

Con este estudio descriptivo se busca, medir, evaluar o recolectar datos sobre diversos conceptos (Variables), aspectos, dimensiones o componentes del fenómeno a investigar, en un estudio descriptivo se seleccionan una serie de cuestiones y se mide o recolecta información sobre cada una de ellas para así (véase la redundancia) describir lo que se investiga (Hernández, et al., 2006).

Además de describir el fenómeno, tratan de buscar la explicación del comportamiento de las variables. Su metodología es básicamente cuantitativa y su fin último es el descubrimiento de las causas. Se pueden considerar entre las disciplinas planteadas para el desarrollo de la metodología aplicada está el diseño experimental. (Hernández, et al., 2003).

9.1.2. LINEA DE INVESTIGACION: Sostenibilidad y gestión ambiental

9.1.3. SUB-LINEA DE INVESTIGACION: Recurso Suelo

9.2. POBLACIÓN

La población de hectáreas afectadas por los cultivos de algodón en las cinco fincas aledañas al municipio de Bosconia están estimadas en 2237 hectáreas las cuales entraron en nuestro tema de investigación.

9.3. MUESTRAS

En cada una de estas fincas se tomaron varias muestras de suelo, el muestreo consistió en realizar las tomas en zig-zag, tomando en cada punto una muestra simple, se tomaron un total de 10 muestras, después se revolviaron y sacamos la muestra de donde se realizaron los análisis al suelo. En cada uno de los potreros,

utilizamos 1m² de suelo a extraído de cada una de las fincas del municipio de Bosconia-Cesar.

9.4. Desarrollo metodológico

9.4.1. ETAPA 1. Obtención de la información técnica e instrumentos de recolección de la información.

La información de este proyecto se obtuvo de 2 maneras, recolección de información primaria y secundaria.

Información primaria: se consiguieron de libros, tesis de grados, revistas científicas, artículos científicos, que tienen que ver con la investigación planteada. La recolección de la información se dio mediante un barrido electrónico en la web por las principales bases de datos académica como son: Google académico, Scielo, ScienceDirect y el portal de revistas científica para Latino América Redalyc.

La información secundaria se logró de los análisis de laboratorio, trabajo en campo y encuestas en las fincas afectadas a estudiar.

9.4.2. ETAPA 2. Toma de muestra de suelo por el método de cuarteo y zigzag

Las muestras de suelos se recolectaron en cinco fincas localizadas en el municipio, las cuales estaban divididas por potreros, donde anteriormente se cultivaba algodón y que en la actualidad están destinados, en su mayoría, a sistemas de pastoreo extensivo; además se encuentran pequeñas zonas que se utilizan para cultivos de maíz, pasto de corte y de palma de aceite.

De cada cultivo o potrero se tomaron 10 muestras del suelo de la rizosfera a una profundidad de 12 a 15 cm, el muestreo se realizó en forma de zig-zag a lo largo del cultivo.

9.4.3. ETAPA 3. Exploración microbiana

Aislamiento primario: Este se efectuó al terminar el recorrido en cada cultivo o potrero, luego se mezclaron las muestras y se realizó un cuarteo, para obtener una muestra representativa de aproximadamente 500g, se tomó un punto de la muestra y se introdujo 1g de la muestra en un frasco de vidrio mediano el cual contenía

aproximadamente 4 ml de medio de Burk's líquido (caldo libre de nitrógeno) Park et al., (2005), luego se llevó a incubación a una temperatura promedio de 28°C por un tiempo de 48 horas, al terminar esto se observó la turbidez presentada.

Aislamiento secundario: Una vez que se obtuvieron las colonias en el aislamiento primario, se realizaron siembras por estrías en cajas con medio Burk's sólidos, luego fueron incubadas por 3 días a una temperatura de 28°C, al pasar este tiempo se observó el crecimiento morfológico que adquirieron las colonias y células, esto se realizó por medio de la coloración de Gram.

Luego de obtener los resultados de los aislamientos procedimos a realizar unas observaciones macro y microscópicamente a las bacterias aisladas en la presente investigación, esto se desarrolló por medio de la Tinción de Gram

9.4.4. ETAPA 4. Identificación microbiana

Para identificar los microorganismos a nivel de los géneros *azotobacter sp* y *azospirillum sp*, se realizó mediante observaciones, análisis microscópicos, macroscópicos y pruebas bioquímicas.

En cuanto a la identificación de bacterias *azotobacter sp* se logró por medio de observaciones y análisis macroscópicos y microscópicos, como se encuentran descritos en la etapa anterior.

9.4.5. ETAPA 5. Cuantificación de ácido indolacético por métodos colorimétricos.

Para cuantificar el ácido indolacético, primero se realizó una curva de calibrado, la cual consistió en estandarizar el espectrofotómetro que se encuentra ubicado en el laboratorio de biotecnología (GRUBIODEQ) de la Universidad de Córdoba, posteriormente se realizó la preparación de soluciones patrones: se prepararon soluciones de 3.2, 6.4, 9.6, 12.2, 16, 24, 30.4 y 45 ppm a partir de una solución estándar de 160 ppm, estas soluciones se realizaron por triplicado en un volumen final de 10 mL.

Una vez preparadas las soluciones patrones se tomaron 3 mL de cada una y se le adicionaron 1.5 mL de reactivo Salkowski (para la preparación se utilizaron 20 mL

de cloruro férrico ($\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) al 5% y se le adiciono 22,55 mL de Ácido Sulfúrico concentrado (36N) Y 57,45 mL de agua destilada), la mezcla se realizó en baño con hielo para evitar el aumento de la temperatura. Se agitaron los tubos y se dejaron en reposo durante 30 min y posteriormente se midió la absorbancia a 527 nm en el espectrofotómetro (GENESYS™ 20); luego con los datos obtenidos se realizó la curva patrón y se determinó su ecuación.

Procedimiento para cuantificación: Con base en lo anterior se tomaron una colonia de cada aislado y se inocularon en 25 ml del medio liquido Burk's; se agregó L-triptófano (100 ppm) para inducir a la producción del AIA, se colocaron en un Shaker con agitación constante a 150 rpm y a una temperatura de 30°C, durante 72 horas en la oscuridad. Al finalizar este proceso se centrifugaron alícuotas de 10ml a 2500 rpm durante 20 minutos. En un tubo de ensayo se tomaron 4 ml de sobrenadante y se le adicionaron 2.0 ml de reactivo Salkowski (relación 2:1) a cada muestra; se definió el tiempo de revelado. Luego se leyeron las absorbancias en el espectrofotómetro GENESYS™ 20. La técnica se modificó, adapto y estandarizo según las condiciones del equipo, se utilizó la longitud de onda y la ecuación de calibrado; todos los ensayos se realizarán por triplicados.

9.4.6. Pruebas bioquímicas:

Para la identificación de bacterias *azotobacter sp.*, tuvimos que recurrir a siembras en pruebas bioquímicas, donde las bacterias se inocularon en tubos de ensayos, los cuales contenían medios TSI, SIM, LIA, CITRATO y UREA. Luego utilizamos una punta de un asa lineal la cual se introdujo a unos 4 mm del fondo del tubo, al retirarla se hicieron unos movimientos hacia todos lados, al terminar se incubaron a 35°C durante 24 horas y se tomaron los datos finales.

9.4.7. ETAPA 6. Comparación de porcentaje de bacterias encontradas.

Luego de aislar e identificar las bacterias se llevó a cabo una comparación de concentraciones de producción de ácido indolacético de cada finca, teniendo en cuenta la cantidad de absorbancia. En esta investigación se identificó cuál de estas fincas tiene mayor capacidad de ácido indolacético en la regeneración vegetal.

9.4.8. ETAPA 7. Lugar de la investigación

El experimento se desarrolló en 5 fincas del municipio de Bosconia-Cesar, donde las temperaturas oscilan entre 28.4°C a 40°C. Con respecto al suelo se tendrán en cuenta los parámetros como porcentaje de humedad, carbono orgánico, materia orgánica, nitrógeno y pH.

Las fincas donde se realizaron la zona de muestreo se encuentran en las afueras del municipio de Bosconia, La finca **El Caribe** (9.958422, -73.879423) se encuentra a 2,5 Km en la vía de Bosconia-El Paso donde en los años 1985-1998 hubo monocultivos de algodón y que en la actualidad este suelo se utiliza para pastoreo extensivo. **La Hacienda la Claralicia** (9.966162, -73.891547) (9.958466, -73.902654), esta se encuentra a escasos 300 metros del casco urbano en la vía Bosconia-Plato, por lo que se dice que esta delimita al municipio y hoy en día se utiliza para la siembra de cultivos y pastoreo de animales, en esta finca se establecerán dos zonas de muestreo debido a su extensa área. La finca **La Gran Vía** (10.016695, -73.902984), la cual comunica la región de las pavas con el carretable del Alto de las Minas. Este tramo correspondía al denominado callejón de los Vallenatos, consta de una longitud de 3.500 donde solo 500 m se puede transitar en vehículo de automotor y el resto se convirtió en camino de herradura privado. La finca **Las Mercedes** (9.990366, -73.894007) se encuentra en la vía Bosconia-El Copey, para llegar hay que ir por una carretera en regular estado, con una longitud de 4 km. De naturaleza pública. Anteriormente era llamada el callejón de los vallenatos, es la antigua carretera a Barranquilla. Sirve de límite entre el Municipio de El Copey y el municipio de Bosconia¹⁵.

¹⁵ PLAN DE ACCIÓN MUNICIPAL PARA LA PREVENCIÓN, ASISTENCIA, ATENCIÓN, PROTECCIÓN Y REPARACIÓN INTEGRAL A LAS VÍCTIMAS DEL CONFLICTO

Imagen 3. Ubicación de las fincas de muestreo.



(Fuente: GoogleMaps, 2017)

10. RESULTADOS Y ANALISIS

10.1. Exploración de microorganismos

Las cinco fincas seleccionadas del municipio de Bosconia-Cesar, se les realizó la toma de muestras, en donde por cada finca se tomaron cuatro muestras representativas en forma de zigzag con un total de muestras escogidas de 20 muestras. Las fincas donde se realizaron las recolecciones de muestras son las siguientes: **La hacienda la claralicia**, esta se encuentra a escasos 300 metros del casco urbano en la vía Bosconia-Plato. La finca **El caribe**, se encuentra a 2,5 Km en la vía de Bosconia-El Paso. **Las Mercedes** se encuentra en la vía Bosconia-El Copey, a una distancia de 4 km del casco urbano. La finca **La Gran Vía** la cual comunica la región de las pavas con el carreteable del Alto de las Minas.

Fase de laboratorio:

Un día previo a la recolección de las muestras, fueron realizado los medios de caldo burk`s y burk`s solido (caldo libre de nitrógeno) en el laboratorio de microbiología de suelos del grupo de investigación "MAGYA" de la universidad popular del cesar.

10.2. Exploración microbiana

AISLAMIENTO PRIMARIO:

Primero se le realizo un aislamiento primario, donde se tomó 1 gramo de la muestra y se introdujo en un frasco de vidrio el cual contenía 4ml de medio selectivo burk`s liquido (caldo libre de nitrógeno) Park et al., (2005), el procedimiento se realizó en la cabina con el mechero encendido para evitar la contaminación de los medios y las muestras, después de esto se dejó en la incubadora por 48 horas a 28°C.

AISLAMIENTO SECUNDARIO:

Luego de esperar las 48 horas, procedimos a realizar las siembras por estrías en cajas con medios selectivo Burk's sólido, fueron llevadas a la cabina y en presencia de un mechero para evitar contaminación de las muestras y los medios, los cuales fueron sembrados con las colonias obtenidas en el aislamiento primario; luego fueron incubadas por 3 días a una temperatura de 28°C. Después de pasar los 3 días se observó el crecimiento morfológico que tuvieron las colonias.

10.3. Identificación de microorganismos

Seguidamente del crecimiento de las colonias se realizó observaciones macroscópicas y microscópicas para confirmar las posibles características (forma, tamaño elevación, margen, superficies y opacidad) basándonos en el manual de Bergey's, (Holt et al. 1994; Buchanan y Gibbons, 2004), para determinar cuál era la morfología de las bacterias azotobacter y azospirillum. Obtenido estos resultados se realizaron nuevamente medios Burk's sólidos para realizar un aislamiento de cepas puras.

Las 20 cepas aisladas fueron nombradas de la siguiente manera:

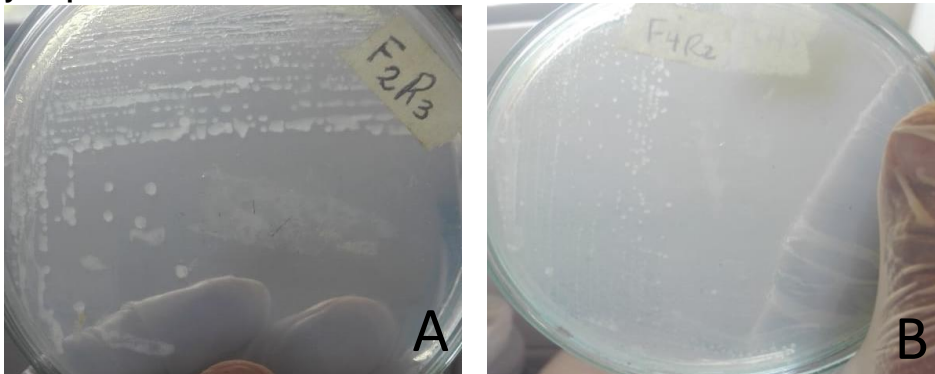
Tabla 2. Nombres de las muestras.

Finca 1	F1R2
	F1R3
	F1R4
	F1R5
Finca 2	F2R2
	F2R3
	F2R4
	F2R5
Finca 3	F3R2
	F3R3
	F3R4
	F3R5
Finca 4	F4R2
	F4R3
	F4R4
	F4R5
Finca 5	F5R2
	F5R3
	F5R4
	F5R5

10.3.1. Morfología de las colonias

Al finalizar los aislamientos se evidenciaron dos tipos de morfologías diferentes de colonias (imagen 4). La mayoría de las colonias aisladas presentaron color crema, otras un poco más beige, presentaron formas circulares, convexas, medianas y brillantes; características muy parecidas para azotobacter. Además, se presentaron otras colonias pequeñas y brillantes. (Jiménez 2007)

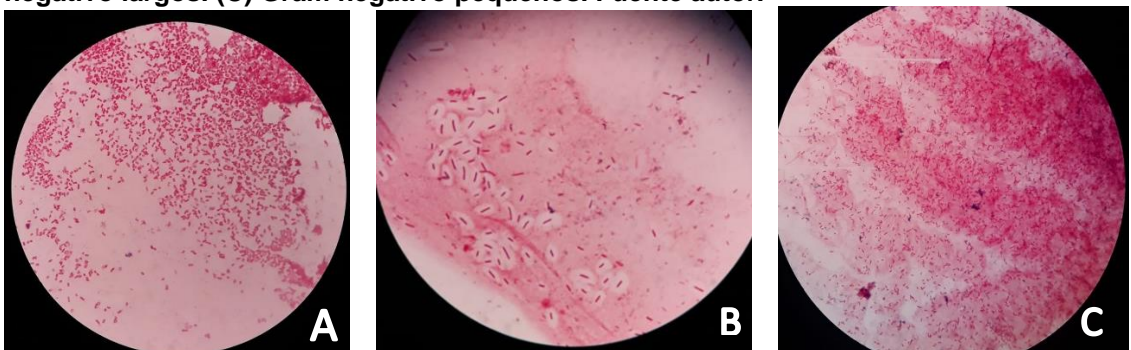
Imagen 4. (A) Morfología circular y convexa color crema. (B) Morfología circulares pequeñas y un poco brillantes. Fuente: Autor



10.3.2. Morfología de las células

Luego de la coloración de Gram, logramos observar tres tipos de morfologías celulares como los siguientes: bacilos Gram negativos largos, formas esféricas que formaban quistes, algunos de estos agrupados (imagen 5). Estas morfologías son similares a las reportadas para el género azotobacter. No obstante, se evidencio bacilos Gram negativo pequeños y cortos. (Jiménez 2007)

Imagen 5. (A) Morfología Gram negativo, formas esféricas que forman quistes. (B) Gram negativo largos. (C) Gram negativo pequeños. Fuente autor.



Mediante la coloración de Gram y vistas macroscópica y microscópicamente, pudimos observar lo siguiente:

Tabla 3. Observaciones macro y microscópicamente. Fuente autor.

CEPAS	OBSERVACIONES		
	Macroscópica	Microscópica	Forma
F1R2	A	X	Alargados
F1R3	AB	X	Cortos
F1R4	AB	Y	Óvalos grandes
F1R5	A	Y	Óvalos grandes
F2R2	B	Z	Bacilos largos, cortos y ovalados
F2R3	B	X	Bacilos cortos
F2R4	B	X	Bacilos agrupados
F2R5	B	Y	Ovalados grandes
F3R2	A	Z	Cocos en pareja y Bacilos cortos
F3R3	A	X'	Gruesos y alargados en forma de bastón
F3R4	A	X'	Cortos
F3R5	A	Q	Agrupados negativos
F4R2	A	X'	Bacilos pequeños
F4R3	A	Z	Cocos en pareja y Bacilos cortos
F4R4	A	Z	Cocos en pareja y Bacilos cortos
F4R5	A	Z	Cocos en pareja y Bacilos cortos
F5R2	A	X'	Bacilos pequeños
F5R3	A	Z	Cocos en parejas
F5R4	A	X'	Bacilos pequeños
F5R5	A	X'	Bacilos pequeños

A = colonias convexas y forma regular.

B = colonias secas, redondeadas, cremosas y color beige.

Q = quistes pequeños Gram negativos.

X = presencia de bacilos Gram negativos, presuntiva para azospirillum.

X' = presencia de bacilos Gram negativos, presuntiva para azotobacter.

Y = presencia coco bacilos Gram negativos presuntivos azotobacter.

Z = presencia de bacilos Gram negativos y cocos ovalados. Presuntivos para azotobacter.

10.4. Cuantificación de la producción de Ácido Indol Acético

Para la cuantificación de la producción de ácido indolacético, se utilizó un espectrofotómetro GENESYS™ 20, la técnica fue modificada, adaptada y estandarizada según las condiciones del equipo, se utilizó una longitud de onda de 527 nm y la ecuación de calibrado $y = 0,0295x + 0,0308$ $R^2 = 0,9985$. Los ensayos se realizaron por triplicado.

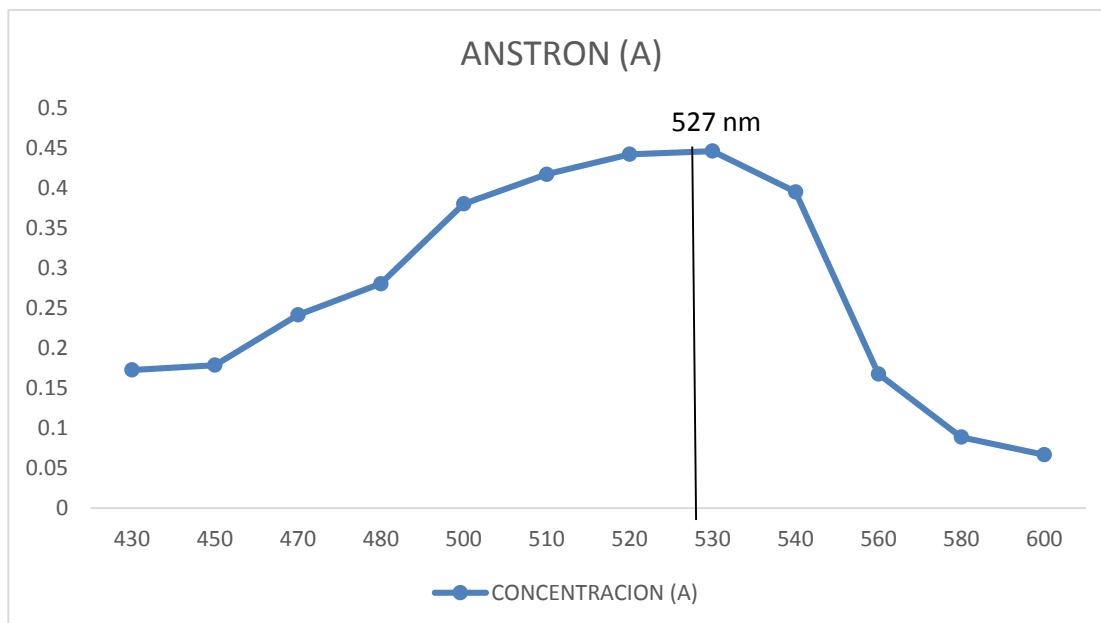
Este equipo se encuentra ubicado en el laboratorio de biotecnología del grupo de investigación GRUBIODEQ de la Universidad de Córdoba. (Lara et al., 2007)

10.4.1. Preparación de la curva de calibrado:

Primero se realizó un barrido a una concentración de 12,2 ppm, para establecer el valor de la longitud de onda que se utilizó para el presente proyecto. (Lara et al., 2007).

Tabla 4. Datos de barrido. Fuente autor.

LONGITUD DE ONDA (nm)	ABSORBANCIA (A)
430	0,173
450	0,179
470	0,242
480	0,281
500	0,381
510	0,418
520	0,443
530	0,447
540	0,396
560	0,168
580	0,089
600	0,067



Gráfica 1. Máxima absorbancia.

De la gráfica anterior podemos derivar que la longitud de onda del espectrofotómetro GENESYS™ 20, escogida fue de 527 nm, se escogerá el punto más alto de la curva. A partir del valor de la longitud de onda obtenido del espectrómetro, procedimos a realizar una solución estándar para poder medir los niveles de absorbancia para cada tipo de concentración y hallar la curva de calibración donde posteriormente utilizamos la ecuación de la pendiente.

Preparación de solución estándar:

Se preparó una solución estándar a partir de una concentración de 160 ppm, el cual nos arrojó un valor de 0,16 gramos por litro. Como realizamos 100 ml de agua, despejamos 0,16 gramos/Litro, y al final obtuvimos los valores para cada volumen con respecto a cada concentración.

$$160\text{ppm} = \frac{160 \text{ mg}}{1 \text{ Litro}} * \frac{1 \text{ g}}{1000 \text{ mg}} = 0,16\text{gr/L}$$

$$1000 \text{ ml} \rightarrow 0,16 \text{ gr}$$

$$100 \text{ ml} \rightarrow x$$

$$x = \frac{100 \text{ ml} * 0,16\text{gr}}{1000 \text{ ml}} = 0,016 \text{ gr}$$

0,016 gr en 100 ml de agua destilada

$$* C_1V_1 = C_2V_2$$

C_1 = Concentración 1 (160 ppm)

V_1 = Volumen 1 (X)

C_2 = Concentración 2 (cada una de las concentraciones: 3.2, 6.4, 9.6, 12.2, 16, 24, 30.4 y 45 ppm)

V_2 = Volumen 2 (10 ml)

Despejando V_1 , nos queda la siguiente ecuación.

$$V_1 (X) = \frac{C_2 * V_2}{C_1}$$

Nos quedan los siguientes datos:

$$V_1 (X) = \frac{3,2 \text{ ppm} * 10 \text{ ml}}{160 \text{ ppm}} = 0,2 \text{ ml Aforar a 10ml de agua destilada}$$

$$V_1 (X) = \frac{6,4 \text{ ppm} * 10 \text{ ml}}{160 \text{ ppm}} = 0,4 \text{ ml Aforar a 10ml de agua destilada}$$

$$V_1 (X) = \frac{9,6 \text{ ppm} * 10 \text{ ml}}{160 \text{ ppm}} = 0,6 \text{ ml Aforar a 10ml de agua destilada}$$

$$V_1 (X) = \frac{12,2 \text{ ppm} * 10 \text{ ml}}{160 \text{ ppm}} = 0,76 \text{ ml Aforar a 10ml de agua destilada}$$

$$V_1 (X) = \frac{16 \text{ ppm} * 10 \text{ ml}}{160 \text{ ppm}} = 1 \text{ ml Aforar a 10ml de agua destilada}$$

$$V_1 (X) = \frac{24 \text{ ppm} * 10 \text{ ml}}{160 \text{ ppm}} = 1,5 \text{ ml Aforar a 10ml de agua destilada}$$

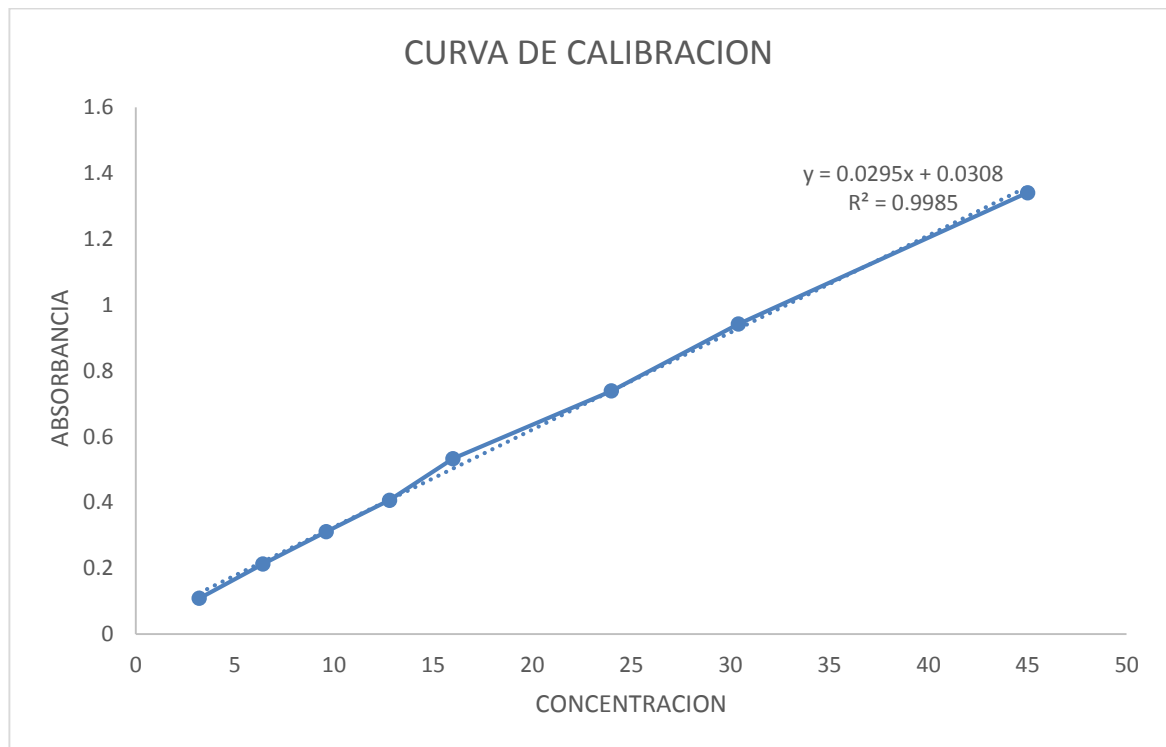
$$V_1 (X) = \frac{30,4 \text{ ppm} * 10 \text{ ml}}{160 \text{ ppm}} = 1,9 \text{ ml Aforar a 10ml de agua destilada}$$

$$V_1 (X) = \frac{45 \text{ ppm} * 10 \text{ ml}}{160 \text{ ppm}} = 2,8 \text{ ml Aforar a 10ml de agua destilada}$$

Al terminar de sacar los cálculos para cada concentración y aforarlos a 10 ml, se tomaron alícuotas de cada tubo de ensayo y se llevaron al espectrofotómetro para medir su absorbancia (tabla 5), con el fin de obtener la curva de calibrado.

Tabla 5. Concentración Vs Absorbancia

CONCENTRACION (ppm)	ABSORBANCIA (A)
3,2	0,109
6,4	0,213
9,6	0,311
12,8	0,407
16	0,533
24	0,739
30,4	0,942
45	1,341



Gráfica 2. Curva de calibración.

Ecuación de la pendiente: $y=mx \pm b$

Al despejar x nos queda la ecuación de la siguiente manera:

$$X= (ABSORBANCIA-0,0308) / 0,0295$$

10.4.2. Preparación del AIA

Con base en lo anterior se tomó una colonia de cada aislado y fueron inoculadas en 25 ml de medio líquido Burk's; se agregó L-triptófano (100 ppm) para inducir a la producción del AIA, se colocaron en un Shaker con agitación constante a 150 rpm y a una temperatura de 30°C, durante 48 horas en la oscuridad.

Luego de pasar las 48 horas realizamos unas alícuotas, que fueron llevadas a centrifugar por 20 minutos a 2500 rpm, después de esto se tomaron 3 ml del sobrenadante de cada muestra y a cada uno se le agregó 1,5 ml de reactivo de salkowski; posterior de esto se esperó 30 minutos y se llevaron a medir su absorbancia al espectrofotómetro (protocolo para evaluación química de la producción de ácido indolacético (AIA). Lara y Oviedo Unicórdoba), cada una se realizó por triplicado y se le sacó un promedio y a ese dato se le restó el valor de la absorbancia del blanco que en este caso fue de 0,077.

Imagen 6. Tubos con ácido indolacético para medir la absorbancia.

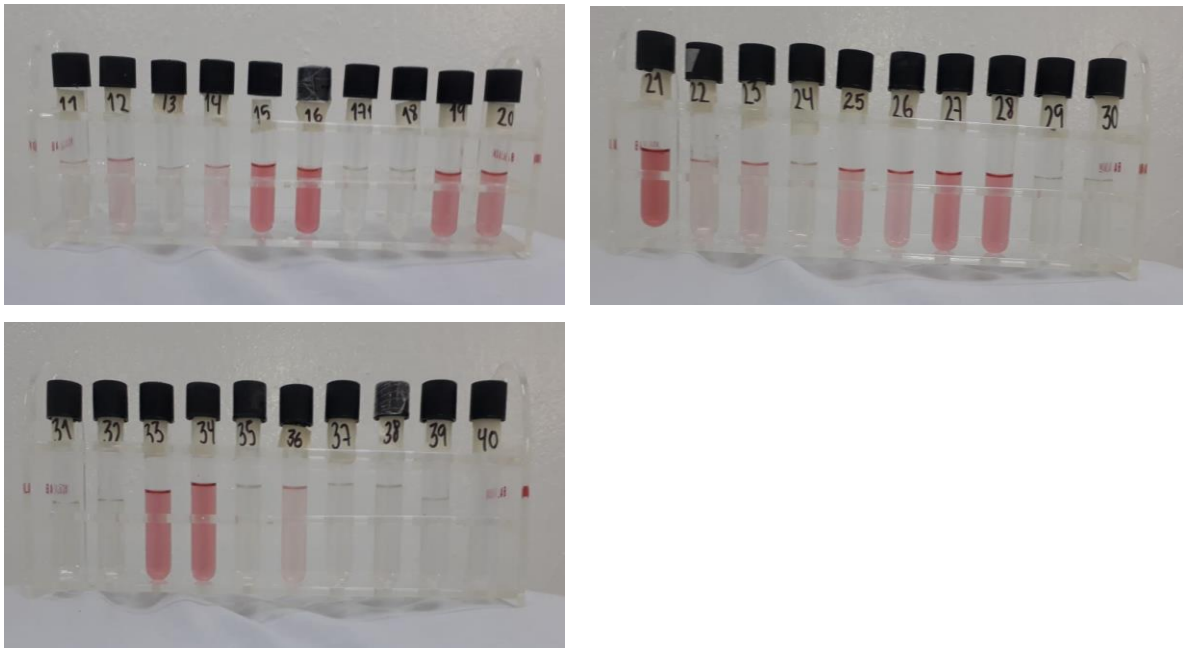


Tabla 6. Datos de la absorbancia.

FINCAS	DATO 1	DATO 2	DATO 3	ABSORBANCIA (A)
F1R2	0,065	0,149	0,107	0,030
F1R3	0,081	0,082	0,082	0,005
F1R4	0,545	0,382	0,464	0,387
F1R5	0,377	0,378	0,378	0,301
F2R2	0,120	0,101	0,111	0,034
F2R3	0,121	0,200	0,161	0,084
F2R4	0,155	0,178	0,167	0,090
F2R5	0,566	0,686	0,626	0,549
F3R2	0,116	0,090	0,103	0,026
F3R3	0,470	0,360	0,415	0,338
F3R4	0,666	0,154	0,410	0,333
F3R5	0,233	0,120	0,177	0,100
F4R2	0,278	0,258	0,268	0,191
F4R3	0,427	0,415	0,421	0,344
F4R4	0,089	0,095	0,092	0,015
F4R5	0,089	0,098	0,094	0,017
F5R2	0,468	0,488	0,478	0,401
F5R3	0,104	0,164	0,134	0,057
F5R4	0,071	0,106	0,089	0,012
F5R5	0,093	0,099	0,096	0,019
BLANCO	0,077	0,077	0,077	

Al tener la absorbancia de cada finca y de sus réplicas, procedimos a calcular la concentración para cada una de ellas, con la ecuación hallada en la curva de calibración (Grafica 2. Curva de calibración):

$$X = \frac{\text{ABSORBANCIA} - 0,0308}{0,0295}$$

$$F1R2 = \frac{0,030 - 0,0308}{0,0295} = 0,0 \text{ ppm}$$

$$F1R3 = \frac{0,05 - 0,0308}{0,0295} = 0,0 \text{ ppm}$$

$$F1R4 = \frac{0,387 - 0,0308}{0,0295} = 12,1 \text{ ppm}$$

$$F1R5 = \frac{0,301 - 0,0308}{0,0295} = 9,1 \text{ ppm}$$

$$F2R2 = \frac{0,034 - 0,0308}{0,0295} = 0,1 \text{ ppm}$$

$$F2R3 = \frac{0,084 - 0,0308}{0,0295} = 1,8 \text{ ppm}$$

$$F2R4 = \frac{0,09 - 0,0308}{0,0295} = 2,0 \text{ ppm}$$

$$F2R5 = \frac{0,549 - 0,0308}{0,0295} = 17,6 \text{ ppm}$$

$$F2R5 = \frac{0,026 - 0,0308}{0,0295} = 0,0 \text{ ppm}$$

$$F2R5 = \frac{0,338 - 0,0308}{0,0295} = 10,4 \text{ ppm}$$

Tabla 7. Concentración para cada absorbancia.

FINCAS	ABSORBANCIA (A)	CONCENTRACION (ppm)
F1R2	0,030	0,0
F1R3	0,005	0,0
F1R4	0,387	12,1
F1R5	0,301	9,1
F2R2	0,034	0,1
F2R3	0,084	1,8
F2R4	0,090	2,0
F2R5	0,549	17,6
F3R2	0,026	0,0
F3R3	0,338	10,4
F3R4	0,333	10,2
F3R5	0,100	2,3
F4R2	0,191	5,4
F4R3	0,344	10,6
F4R4	0,015	0,0
F4R5	0,017	0,0
F5R2	0,401	12,5
F5R3	0,057	0,9
F5R4	0,012	0,0
F5R5	0,019	0,0

10.4.3. Pruebas Bioquímicas

La identificación bioquímica se les realizó a las muestras que presentaron mayor rendimiento de absorbancia en la prueba de ácido indolacético, esta prueba se ejecutó utilizando tubos de ensayos los cuales contenían medios TSI, SIM, LIA, CITRATO y UREA. Estos medios nos permitieron identificar la presencia de

microorganismos requeridos para el presente trabajo, en la tabla 8 se muestran los resultados de las caracterizaciones bioquímicas de todas las cepas aisladas.

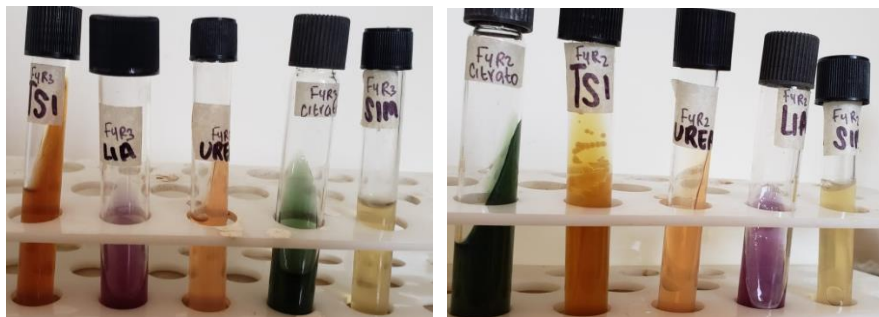
Tabla 8. Pruebas bioquímicas. Fuente autor.

PRUEBAS BIOQUIMICAS	TSI	SIM (INDOL)	LIA	CITRATO	UREA
F1R4	-	-	-	+	+
F1R5	-	+	-	+	+
F2R5	-	+	-	+	+
F3R3	-	-	-	+	+
F3R4	-	+	Descarboxilasa	+	+
F4R2	-	+	-	+	+
F4R3	-	-	-	+	+
F5R2	-	-	-	+	+

+ = pruebas positivas
 - = pruebas negativas

Descarboxilasa = enzima respiratoria que produce la eliminación del grupo carboxilo.

Imagen 7. Pruebas bioquímicas. Caracterizaciones bioquímicas de los aislamientos de las fincas donde obtuvieron mayor absorbancia. Fuente autor.



Teniendo en cuenta la información de la tabla 8, podemos deducir que las muestras dieron positivas para citrato y urea, negativas para TSI y LIA, en cuanto el SIM unas salieron negativas para movilidad (F1R4, F3R3, F4R3 y F5R2) y las demás salieron positivas (Troya 2010).

Debido a que los resultados bioquímicos pueden ser enigmáticos para diferentes tipos de bacterias del género azotobacter, se tuvieron en cuenta las observaciones macroscópicas y microscópicas, así como los resultados obtenidos en el medio selectivo Burk's Korea para lograr su identificación..

10.5. Comparación de las concentraciones.

La presencia de bacterias azospirillum en las muestras fueron muy pocas, en su gran mayoría fueron bacterias azotobacter, por lo tanto, no se pudo realizar una comparación de concentración entre varias bacterias porque obtuvimos un solo género de bacterias, en este caso azotobacter.

Por lo anterior decidimos ejecutar una comparación entre las fincas que presentaron mayor concentración de ácido indolacético de acuerdo a las concentraciones de cada finca.

Con base a la información de la tabla 7 se realizó un promedio de las concentraciones de cada finca, donde obtuvimos los siguientes datos:

Tabla 9. Comparación de promedio de concentración entre cada finca.

NUMERO	PROMEDIO DE CONCENTRACIÓN	FINCAS
1	5,29	La Claralicia 1
2	5,36	La Gran Vía
3	5,75	Las Mercedes
4	4,01	El Caribe
5	3,36	La Claralicia 2

De acuerdo a la tabla 9, logramos determinar que la finca que presento mayor concentración de ácido indolacético fue la finca número 3 (las mercedes), esto indica que, los microorganismos del género azotobacter nativos presentes en esta finca tuvieron un desarrollo más acelerado para generar hormonas promotoras de crecimiento vegetal, reduciendo de esta manera el uso de agroquímicos y contribuyendo a la restauración natural de los ecosistemas. (Borda M. *et al.*, 2009).

10.6. Lugar de investigación

En la finca que presento mayor concentración de ácido indolacético se procedió a realizarle unos exámenes físico-químicos con respecto a los siguientes parámetros: porcentaje de humedad, carbono orgánico, materia orgánica, nitrógeno y pH; con el fin de determinar en qué condiciones se encuentra la finca las mercedes, donde se obtuvieron los siguientes datos:

pH = 6.6 (anexo B), con respecto a la tabla de análisis de datos de Molina y Meléndez 2002 (anexo H), el pH obtenido en esta finca es óptimo para diferentes actividades como la agrícola.

Porcentaje de materia orgánica = 3.7 % (anexo C), el resultado obtenido para la finca las mercedes, con respecto a la tabla (anexo H), es medio en porcentaje de materia orgánica.

Carbono orgánico = 1.37% (anexo D), para el análisis de carbono orgánico se utilizó la tabla de análisis químico de suelo del IGAC (anexo G), donde logramos concluir que el porcentaje de carbono orgánico en un clima cálido como lo es el municipio de Bosconia-Cesar, la apreciación a nivel agrícola es media.

Nitrógeno total = 0.0689% (anexo E), el porcentaje de nitrógeno obtenido entraría en una apreciación agrícola baja (anexo G).

Porcentaje de humedad = 3.92% (anexo F).

Con respecto a estos resultados y sus respectivos análisis, logramos deducir que el terreno de la finca las mercedes, las condiciones físico-químicas se encuentran a un nivel medio-óptimo para implementar actividades agrícolas.

11. CONCLUSIÓN

- Con esta investigación podemos concluir que, a pesar de la contaminación generada por el uso de pesticidas, agroquímicos entre otros, en los monocultivos de algodón en el municipio de Bosconia-Cesar. Se pudo comprobar que a través de los años y sin ayuda del hombre estas bacterias nativas del genero azotobacter sp, se encuentran presentes en la rizosfera y son capaces de fijar nitrógeno a pesar de las condiciones en la que este suelo fue dejado.
- El hallazgo de las bacterias azotobacter sp y las revisiones bibliográficas nos permiten deducir que estos microorganismos son estimuladores de crecimiento vegetal del tipo de las auxinas. En las últimas décadas se ha observado que las asociaciones entre las procariotas y las plantas son de gran importancia para la agricultura como herramienta para mejorar el rendimiento de los cultivos y la preservación del ambiente, lo que se complementa con la reducción de los riesgos por el uso de fertilizantes químicos (Pedraza 2008). Tomando en cuenta lo anterior, se corrobora que las cepas aisladas F1R4, F1R5, F2R5, F3R3, F4R2, F4R3 Y F5R2, del género azotobacter sp nativas, produjeron hormonas estimuladoras del crecimiento vegetal, como las auxinas.
- La recuperación del suelo a partir de unos microorganismos nativos que permiten el crecimiento de plantas son conocidos como biofertilizantes, los cuales van a contribuir al ciclo biológico de las plantas y animales. Algunas bacterias contribuyen a resolver problemas de contaminación generados por el hombre, degradando la materia orgánica y ayudando a la fijación de algunos compuestos en el suelo como el Nitrógeno, aportando a la fertilidad del suelo, restaurando los ecosistemas, la fauna y flora presente en las zonas escogidas en esta investigación. Por estas razones el estudio de las bacterias en ingeniería ambiental y sanitaria tiene gran importancia; en la presente investigación se observó que en los potreros que presentaron mayor

concentración de ácido indolacético presentó mayor cantidad de bacterias nativas *azotobacter* sp, lo que conllevó a que estas zonas estuvieran más pobladas de vegetación por el poder de fijación de nitrógeno actuando así como biofertilizantes, de esta manera colaborando con la restauración parcial de la flora y fauna de estos potreros. Resolviendo algunos problemas de contaminación y desertificación generados por los monocultivos de algodón en el municipio de Bosconia-Cesar.

12. RECOMENDACIONES

Compartir los resultados obtenidos en esta investigación con todos los propietarios de las fincas, brindándole una charla de cómo se encuentra el suelo a nivel de bacterias fijadoras de nitrógeno y la importancia de la presencia de este tipo de bacterias.

Producir un biofertilizante a partir de muestras de bacterias obtenidas en las fincas del presente estudio, con el fin de incrementar la disponibilidad y absorción de nutrientes, de esta manera promover el crecimiento vegetativo de diferentes cultivos que estén presente en la zona de investigación.

En Bosconia-Cesar los cultivos son muy importantes para los agricultores, por esto es importante seguir realizando investigaciones sobre este tema de biofertilizantes, con el fin de seguir validando este producto biológico, ya sea en la parte económica, social o ambiental; con el fin de disminuir la utilización de fertilizantes químicos.

13. BIBLIOGRAFÍA

Agencia para Sustancias Tóxicas y el Registro de Enfermedades. Resúmenes de salud pública - Metilparatión. (2016). Disponible en: http://www.atsdr.cdc.gov/es/phs/es_phs48.html.

Aguado. G., (2012). Introducción al Uso y Manejo de los Biofertilizantes en la Agricultura. México. INSTITUTO NACIONAL DE INVESTIGACIONES FORESTALES, AGRÍCOLAS Y PECUARIAS.

Aguilar, S., Sánchez, M. (1998). Efecto de una rizobacteria nitrificadora y niveles de fertilizante en el comportamiento agronómico del tomate *Lycopersicon esculentum* var. Universidad Nacional de Colombia [Palmira, Colombia], UNC. Acta Agronómica 48 (1-2), 60.

Arshad, M., Frankenberger. Jr. (1998). Plant growth regulating substances in the rhizosphere: Microbial production and functions. Adv. Agron. 62, 45-151.

Barriga, A. (2017). Buscan 'revivir' el cultivo del algodón en el Cesar. Revista EL TIEMPO.

Barea, J.M., Azcón-Aguilar. (1982). La Rizosfera: Interacciones microbio-planta. Anales de Edafología y Agrobiología XII (7-8): 1517-1532.

Bashan, Y., Holguin, G., Ferrera-Cerrato, R. (1996) Interacciones entre plantas y microorganismo benéficos. II. Bacterias asociativas de la rizosfera. Terra. 14(2), 195-209.

Bellone, C., Carrizo de bellone, S. (2001). Azospirillum brasilense induce la producción de jasmonatos en raíces de caña de azúcar. III Reunión Científico Técnica – Biología del Suelo – Fijación biológica del nitrógeno. Universidad Nacional de Salta – Facultad de Ciencias Naturales.

BORDA M., D., PARDO-G., J. M., MARTÍNEZ-S., M. M. & MONTAÑA L., J. S. (2009) Producción de un biofertilizante a partir de un aislamiento de Azotobacter nigricans obtenido en un cultivo de *Stevia rebaudiana* Bert. *Universitas Scientiarum*, 14, pp 71-78

Bowen, G.D., ROVIRA, A. (1999). The Rhizosphere and its management to improve plant growth. *Adv. Agron.* 1-102.

Brown, M., Burlingham, S., Jackson. R. (1962). Studies on Azotobacter species in soil. II. Population of Azotobacter in the Rhizosphere and Effects on Artificial Inoculation. *Plant and Soil.* 28, 320- 332.

Castillo, G., Altuna, B., Michelena, G., Sánchez-Bravo, J., ACOSTA, M. (2005). Cuantificación del contenido de ácido indolacético (AIA) en un caldo de fermentación microbiana Instituto Cubano de Investigaciones de los Derivados de la Caña de Azúcar (ICIDCA)

CONTRALORÍA MUNICIPAL DE VALLEDUPAR. (2013). Informe del estado de los recursos naturales y del ambiente del municipio de Valledupar.

Collados, C. (2006). Impactos de inoculantes basados en Azospirillum modificado genéticamente sobre la diversidad y actividad de los hongos de la micorriza arbuscular en rizosfera de trigo y maíz. Granada. Tesis Doctoral Universidad de Granada

Confederación Colombiana del Algodón – CONALGODON. (2017). RESULTADOS Y ANÁLISIS COSTOS DE PRODUCCIÓN COSECHA COSTA 2016 – 2017

Confederación Colombiana del Algodón – CONALGODON. “Resultados de la cosecha algodонера”. Internet: <http://conalgodon.com/estadisticas/#sc-tabs-1522112487513>

Döbereiner, J., Urquiaga, S., Boddey, R. M., Ahmad. N. (1995). Alternatives for nitrogen of crops in tropical agriculture. Nitrogen economy in tropical soil. 339-346.

Döbereiner, J. (1975). Nitrogen fixation in the rhizosphere of tropical grasses. Nitrogen fixation by free-living microorganisms. International Biological Prog. Cambridge University Press. Cambridge, UK. In: Stewart, W.D.P. (ed.). 39-56.

Froni, L. (1999). Procesos Microbianos Tomo II. Editorial de la fundación Universidad Nacional de Río Cuarto (Córdoba). 286.

Fundación Qualitas. “Degradación del suelo y del ambiente por la utilización de agroquímicos”. (2012). Disponible en: <http://www.fundacionqualitas.com.ar/degradacion.html>

Garzón, S., Lamprea, S., Martínez, M. (2001). Desarrollo de una preparación líquida de *Azotobacter* utilizando como medio de cultivo los subproductos de la industria sucroquímica. Bogotá. Tesis de microbiología Industrial. Pontificia Universidad Javeriana. 25.

Jiménez, D. (2007). Caracterización molecular de cepas nativas colombianas de *azotobacter spp.* Mediante el análisis de restricción de DNA ribosomal 16S

Hayat R, Ali S, Amara U, Khalid R, Ashamed I. (2010). Soil beneficial bacteria and their role in plant growth promotion: Annu Rev Microbiol. (Pag. 579-598).

Hernandez, M., Vidal, J., Marrugo, J. (2010). Plaguicidas organoclorados en leche de bovinos suplementados con residuos de algodón en San Pedro, Colombia.

Holt, J. (2000). Bergey's Manual to Determinative Bacteriology. Novena Edición. Baltimore. Maryland. Ed Williams & Wilkins. USA. 77,105,118,135.

Holt, J.G., Krieg, N.R., Sneath, P.H.A. Staley, J.T., Williams, S.T. (1994) Bergey's Manual of Determinative Bacteriology. 9th ed. Williams & Wilkins, Baltimore. 56.

ICA, instituto colombiano agropecuario. (2004). Resolución N° 00375.

Kapulnik, Y., Okon, Y., Kigel, J. (1981) Effects of temperature, nitrogen fertilization and plant age on nitrogen fixation by *Setaria italica* inoculated with *Azospirillum brasilense* (strain cd). Plant Physiology, 68. 340-343.

Lara, C., Oviedo, L., Villalba, M. (2007) Bacterias fijadoras asimbióticas de nitrógeno de la zona agrícola de San Carlos. Córdoba. Colombia. Rev Colomb Biotecnol 9 (2). 6-14.

Lozada, V. Rivas V. (2010) Evaluación del efecto de la inoculación con *Azotobacter* spp en plantas de ají dulce (*Capsicum frutescens*). Merida, Trabajo de grado universidad de los Andes (Venezuela).

Martinez, T. Gonzalez, J. De la rubia, T. Ramos. A. (1985) Isolation and characterization of *Azotobacter chroococcum* from the roots of *Zea mays*. FEMS Microbiology Ecology. Vol.31. 179-203.

Okon, Y. Labandera, G. (1994) Agronomic applications of Azospirillum: and evaluation of 20 years worldwide field inoculation. *Soil Biology & Biochemistry*, 26. 1591-1601.

Park, M.; Chungwoo, K.; JInchul, Y.; Hyoung-seok, L.; Wansik, S.; Seunghwan, K.; Tong-min, S. 2005. Isolation and characterization of diazotrophic growth promoting bacteria from rhizosphere of agricultural crops of Ko-rea. *Microbiological Research* 160: 127-133

Pedraza, O. 2008. Recent advances in nitrogen-fixing acetic acid bacteria. *Int Journal of Food Microbiology* 125: 25-35.

Pedraza, R., Bellone, C., de Bellone, C. (2010). Azospirillum inoculation and nitrogen fertilization effect on grain yield and on the diversity of endophytic bacteria in the phyllosphere of rice rainfed crop. *European Journal of Soil Biology*. (Pag. 36-43).

Plan de desarrollo de Bosconia cesar. "Bosconia más cerca de todo". (2012-2015).

Plan de desarrollo de Bosconia cesar "Todos tenemos derechos" (2016-2019).

Perfil productivo del municipio de Bosconia, programa de las naciones unidas para el desarrollo (PNUD).

Plan de acción municipal para la prevención, asistencia, atención, protección y reparación integral a las víctimas del conflicto (2012-2015)

Ortega, M. R. (1999) Utilización de Inoculante Mixto en maíz. Corrientes. Trabajo final de graduación. FCA-UNNE, 12.

Tejera, N. Llunch, C. Martinez, M. Gonzalez, J. (2005) Isolation and characterization of Azotobacter and Azospirillum strains from the sugarcane rhizosphere. Plant and Soil. Vol 27. 223-232.

Terry, E. Leiva, A. Hernandez, A. (2005) Microorganismo benéfico como biofertilizantes eficientes para el cultivo de tomate (*Lycopersicon esculentum*, Mill). Rev.Colomb. Biotecnol. 7(2). 47-54.

The latin american alliance. (1997). Los biofertilizantes en la agricultura cubana. Disponible en: <http://www.latinsynergy.org/microorganismoscuba2.htm>.

Troya. A., (2010). Caracterización de bacterias nativas diazotroficas secretoras de ácido indolacético (AIA) y evaluación en el crecimiento y desarrollo de pasto *panicum maximun* cv. tanzania en el municipio de la paz (cesar)

Secretaria de agricultura, ganadería, desarrollo rural, pesca y alimentación.
<<https://www.gob.mx/sagarpa>>

14.ANEXOS.

Anexo A. Certificación práctica en la universidad de córdoba.



UNIVERSIDAD DE CÓRDOBA

FACULTAD DE CIENCIAS BÁSICAS

GRUPO DE BIOTECNOLOGIA DEPARTAMENTO DE
QUIMICA Y DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA

-GRUBIODEQ-



DIRECTOR GRUPO DE BIOTECNOLOGÍA

CERTIFICA:

Que los Estudiantes del programa de Ingeniería Ambiental y Sanitaria, **ERLAND DAVID CANTILLO MARTINEZ** identificado con CC. **1063.966.340** y **LUISA FERNANDA HERNANDEZ ANDRADE** identificada con CC: **1065.816.530** de la Universidad Popular del Cesar realizaron la capacitación de Técnicas en análisis de metabolitos producidos por microorganismos fijadores de Nitrógeno, incluidos en la ejecución de su proyecto de grado denominado: "EVALUACIÓN DE BACTERIAS DIAZOTROFICAS EN LA RIZOSFERA EN CINCO FINCAS AFECTADAS POR LOS PESTICIDAS DESPUES DEL ALGODÓN EN BOSCONIA CESAR", en las instalaciones del laboratorio de biotecnología **GRUBIODEQ**, Universidad de Córdoba, entre los días 25 de febrero – hasta el 01 de marzo del 2019.

LUIS ELIECER OVIEDO ZUMAQUE. MSc.
Coordinador Maestría en Biotecnología.
maestriabiotecnologia@correod.unicordoba.edu.co
Celular: 3004136936



Por una universidad con calidad, moderna e incluyente
Carrera 6ª. No. 76-103 Montería NIT. 891080031-3 - Teléfono: 7860300 - 7860920
www.unicordoba.edu.co

Anexo B. Resultado del pH.



Anexo D. Resultado de carbono orgánico.

IGAC		INFORME Y RESULTADOS DE ANÁLISIS DE LABORATORIO Q-44		FECHA	
		GESTIÓN AGROLÓGICA		MM/HH/AA	
				2019-04-23	
NOMBRE Y APELLIDO / EMPRESA / PROYECTO		LUIZA FERNANDA HERNANDEZ ANDRADE		TIPO DE MUESTRA	SUELO
DEPARTAMENTO / MUNICIPIO / LOCALIZACIÓN		Cesar - Bosconia		No. SOLICITUD	3585_1
SUPLEMENTO DE RESULTADOS		<input type="checkbox"/> DE FECHA		DIRECCIÓN DEL CLIENTE CALLE 30 B No 29 - 106	
No. DE LABORATORIO	TIPO DE MUESTRA	IDENTIFICACIÓN DE CAMPO	CARBONO ORGÁNICO %		
MQI-34956	SUELO	FINCA LAS MERCEDES	1.37		
Observaciones:					

*CaCO₃: (+) = BAJO, (++) MEDIO, (+++) ALTO, (++++) Muy Alto, (-) = No presente; NA = No Aplica; N.E = No específica; ND = No Detectado; SAT = Saturado; B.T = Bases Totales; S.A.I (%) = Porcentaje Saturación Addez Intercambiable; S.B (%) = Porcentaje Saturación de Bases; PSI = Porcentaje Saturación de Sodio

NOTA: Los resultados almacenados en la base de datos y los enviados por correo electrónico se conservarán durante tres años a partir de la entrega de los mismos. Las muestras para análisis químicos, físicos y mineralógicos se almacenarán durante seis meses a partir de la fecha de entrega de resultados. Las muestras para análisis biológicos se conservarán 15 días a partir de la fecha de entrega de resultados; aguas y abonos no se conservarán. La información emitida por el Laboratorio Nacional de Suelos, se limita al análisis de la(s) muestra(s) entregadas por el cliente.

Favor comunicar su sugerencia, observación o reclamo al Laboratorio Nacional de Suelos Cra 30 N° 49-51 Bogotá, Telefax: 3694016 ó 3694000 Ext. 91548 y 91266, mail: laboratorio@lgac.gov.co

Prohibida la reproducción parcial sin autorización escrita del Laboratorio.

Certificaciones BVQI para las normas ISO 9001:2015, NTCGP 1000:2009 e ISO 14001:2015

APROBADO POR COORDINADOR DEL GIT:

 JAIME ALVAREZ HERRERA
 NOMBRE

 Firma

Anexo E. Resultado de nitrógeno total.

IGAC		RESULTADO ESPECÍFICO NITRÓGENO TOTAL EN SUELOS Q-07			FECHA
		GESTIÓN AGROLÓGICA			MM/AAAA
					2019-04-23
NOMBRE Y APELLIDO / EMPRESA / PROYECTO		LUIZA FERNANDA HERNANDEZ ANDRADE		TIPO DE MUESTRA	SUELO
DEPARTAMENTO / MUNICIPIO / LOCALIZACIÓN		Cesar - Bosconia		No. SOLICITUD	3686_1
SUPLEMENTO DE RESULTADOS		<input type="checkbox"/>	DE FECHA	DIRECCIÓN DEL CLIENTE CALLE 30 B No 29 - 105	
No. DE LABORATORIO	TIPO DE MUESTRA	IDENTIFICACIÓN DE CAMPO	NITRÓGENO TOTAL %	PROFUNDIDAD (CM)	
MQI-34956	SUELO	FINCA LAS MERCEDES	0.0689	N.A.	
Observaciones:					

*CaCO₃: (+) = BAJO, (++) MEDIO, (+++) ALTO, (++++) Muy Alto, (-) = No presente; N.A = No Aplica; N.E = No específica; N.D = No Detectado; SAT = Saturado; B.T = Bases Totales; S.A.I (%) = Porcentaje Saturación Acidez Intercambiable; S.B (%) = Porcentaje Saturación de Bases; PSI = Porcentaje Saturación de Sodio

NOTA: Los resultados almacenados en la base de datos y los enviados por correo electrónico se conservarán durante tres años a partir de la entrega de los mismos. Las muestras para análisis químicos, físicos y mineralógicos se almacenarán durante seis meses a partir de la fecha de entrega de resultados. Las muestras para análisis biológicos se conservarán 15 días a partir de la fecha de entrega de resultados; aguas y abonos no se conservarán. La información emitida por el Laboratorio Nacional de Suelos, se limita al análisis de la(s) muestra(s) entregadas por el cliente.

Favor comunicar su sugerencia, observación o reclamo al Laboratorio Nacional de Suelos Cra 30 N° 49-51 Bogotá, Telefax: 3694016 o 3694000 Ext. 91548 y 91266, mail: laboratorio@gac.gov.co

Prohibida la reproducción parcial sin autorización escrita del Laboratorio.

Certificaciones BVQI para las normas ISO 9001:2015, NTCGP 1000:2009 e ISO 14001:2015

APROBADO POR COORDINADOR DEL GIT:


JAIME ALVAREZ HERRERA

NOMBRE

Firma

Página 1 de 2


Anexo F. Resultado de porcentaje de humedad.

 RESULTADO DE ANÁLISIS FÍSICOS DE HUMEDAD DE CAMPO F-14 GRUPO INTERNO DE TRABAJO LABORATORIO NACIONAL DE SUELOS		FECHA	
		AAAA-MM-DD	
		2019-04-12	
NOMBRE Y APELLIDO / EMPRESA / _____ DEPARTAMENTO: _____ MUNICIPIO: _____ LOCALIZACIÓN: _____ SUPLEMENTO DE RESULTADOS: <input type="checkbox"/> DE FECHA _____ N.A. DIRECCIÓN DEL CLIENTE: _____		No. SOLICITUD: _____ No. DE LABORATORIO: _____ TIPO DE MUESTRA: _____	
		3585_1	
		MF1-34956	
		SUELO	
		CALLE 30 B No 29 - 105	
No. DE LABORATORIO	Id Campo (Perfil)	Profundidad (cm)	HUMEDAD DE CAMPO, 0g (%)
MF1-34956	FINCA LAS MERCEDES	-	3.92

OBSERVACIONES:	-----

<small> N.A. = NO APLICABLE; N.E. = NO ESPECÍFICA; N.D. = NO DETERMINADO; 0g = Humedad gravimétrica expresada en % NOTA: Los resultados almacenados en la base de datos y los enviados por fax o e-mail se conservarán durante tres meses a partir de la entrega de los mismos. La información emitida por el Laboratorio Nacional de Suelos, se limita al análisis de la(s) muestra(s) entregada(s) por el cliente. Favor comunicar su sugerencia, observación o reclamo al Laboratorio Nacional de Suelos Cra 30 N° 48-51, Telefax 3634016 ó 3634000 Ext. 4016, mail: laboratorio@igac.gov.co. Prohíbida la reproducción parcial sin autorización escrita del Laboratorio. </small>	
APROBADO POR COORDINADOR DEL GIT:	_____ Nombre: JAIME ALVAREZ HERRERA Firma: _____

Anexo G. Consideraciones generales para interpretar los resultados químicos del suelo.

 INSTITUTO GEOGRÁFICO AGUSTÍN CODAZZI SUBDIRECCIÓN DE AGROLOGÍA - LABORATORIO NACIONAL DE SUELOS CONSIDERACIONES GENERALES PARA INTERPRETAR ANÁLISIS QUÍMICOS DE SUELOS											
pH (H ₂ O)	APRECIACIÓN	P mg Kg ⁻¹ (BRAY II)	K omol (+) Kg ⁻¹	C.O (%)			N.Total (%)			CIC omol (+) Kg ⁻¹	SATURACIÓN DE BASES (SB)
				CLIMA			CLIMA				
				FRÍO	MEDIO	CÁLIDO	FRÍO	MEDIO	CÁLIDO		
1:1											
<4.5	BAJO	<16	<0.2	<2.9	<1.7	<1.2	<0.26	<0.16	<0.10	<10	<36
EXTREMADAMENTE ÁCIDO	MEDIO	16 - 40	0.2 - 0.4	2.9 - 8.1	1.7 - 2.9	1.2 - 2.3	0.28 - 0.60	0.16 - 0.30	0.10 - 0.20	10 - 20	36 - 60
4.8 - 6.0	ALTO	>40	>0.4	>8.1	>2.9	>2.3	>0.60	>0.30	>0.20	>20	>60
MUY FUERTEMENTE ÁCIDO	RELACIONES		CLASIFICACIÓN DE ACUERDO CON SALES Y SODIO				PORCENTAJE SATURACIÓN ACIDEZ INTERCAMBIABLE (S.A.I)		APRECIACIÓN		
6.1 - 6.6	APRECIACIÓN	Ca/Mg	Mg/K	Ca/K	(Ca+Mg)/K						
FUERTEMENTE ÁCIDO	RELACIÓN IDEAL	2 - 4	3	8	10	CONDUCTIVIDAD ELECTRICA dS m ⁻¹	PORCENTAJE SATURACIÓN SODIO INTERCAMBIABLE (P8)	CLASE	SIN PROBLEMAS EN GENERAL LIMITANTE PARA CULTIVOS SUSCEPTIBLES		
6.8 - 8.0						0 - 2	INFERIOR	NORMAL	16 A 30		
MEDIANAMENTE ÁCIDO	K DEFICIENTE		>18	>30	>40	2 - 4		LIMITE			
8.1 - 8.6						4 - 8	A	S1	LIMITANTE PARA CULTIVOS MODERADAMENTE TOLERANTES		
LIGERAMENTE ACIDO	Mg DEFICIENTE	>10	<1			8 - 16		S2			
8.8 - 7.3						>16	SUPERIOR	S3	30 A 60		
NEUTRO	CONTENIDO OPTIMO	ELEMENTOS MENORES* (mg Kg ⁻¹)				0 - 4		Na			
7.4 - 7.8		Zn	Cu	Mn	Fe	4 - 8	A	NaS1	LIMITANTE PARA CULTIVOS TOLERANTES		
LIGERAMENTE ALCALINO	SUELO	3 - 8	1.6 - 3	16 - 30	20 - 30	8 - 16		NaS2			
7.9 - 8.4						>16	16%	NaS3	>60		
MEDIANAMENTE ALCALINO	PLANTA	30 - 100	6 - 25	30 - 200	60 - 600						
8.6 - 8.0									NIVELES TÓXICOS PARA LA MAYORÍA DE CULTIVOS		
FUERTEMENTE ALCALINO	*Extraíbles con DTPA en suelos; digestión húmeda en tejido vegetal.						ÁREA DE QUÍMICA				
>9.0	Boro en suelos (extraíble en agua caliente): 0.8 - 1.0 mg Kg ⁻¹ .										
EXTREMADAMENTE ALCALINO	Boro en tejido vegetal: 30-80 mg Kg ⁻¹ .										

NC(Nivel Crítico): 26 mg Kg⁻¹ NO₃; 20 mg Kg⁻¹ NH₄; 20 mg Kg⁻¹ S disponible (Fosfato de calcio)

CONCENTRACION NORMAL EN TEJIDO VEGETAL (Handbook of Reference Methods for Plant Analysis, 1988):

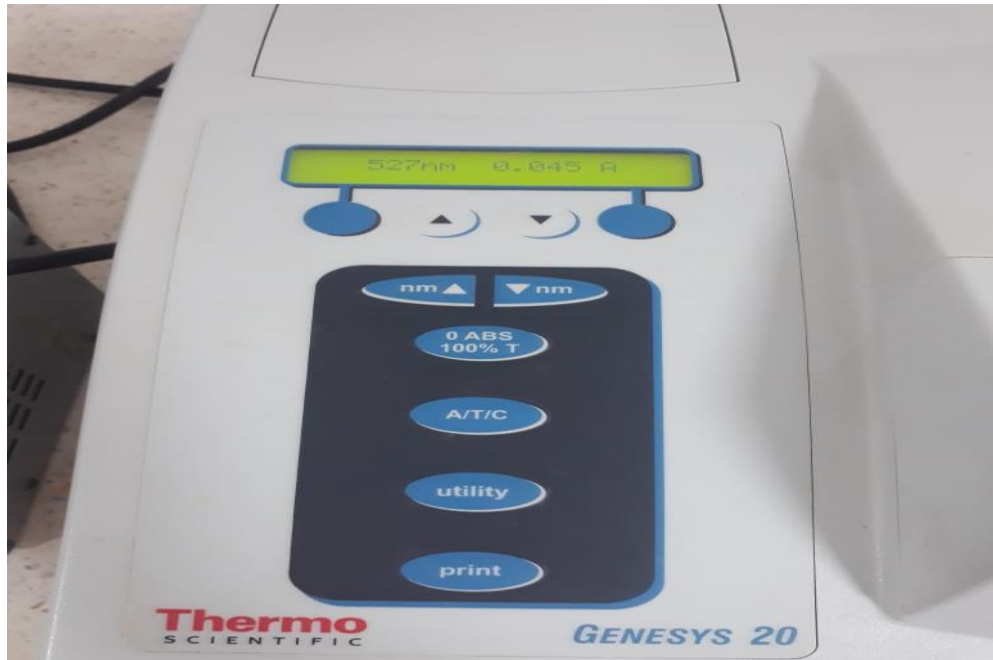
N (%): 2,6-4,6; P (%): 0,20-0,76; K (%): 1,6-6,6; Ca (%): 1,0-4,0; Mg (%): 0,26-1,0; S (%): 0,26-1,0

B (mg Kg⁻¹): 10-200; Cu (mg Kg⁻¹): 6-30; Fe (mg Kg⁻¹): 100-600; Mn (mg Kg⁻¹): 20-300; Zn (mg Kg⁻¹): 27-100; Mo (mg Kg⁻¹): 0.10-0.20; Cl (mg Kg⁻¹): 100-600

Tabla de interpretación de análisis de suelos (Molina y Meléndez 2002).

		Bajo	Medio	Óptimo	Alto
pH		< 5	5 - 6	6 - 7	> 7
Ca	cmol/L	< 4	4 - 6	6 - 15	> 15
Mg	cmol/L	< 1	1 - 3	3 - 6	> 6
K	cmol/L	< 0.2	0.2 - 0.5	0.5 - 0.8	> 0.8
Acidez	cmol/L		0.3 - 1	< 0.3	> 1
S.A.	%		10 - 30	< 10	> 30
P	mg/L	< 12	12 - 20	20 - 50	> 50
Fe	mg/L	< 5	5 - 10	10 - 50	> 50
Cu	mg/L	< 0.5	0.5 - 1	1 - 20	> 20
Zn	mg/L	< 2	2 - 3	3 - 10	> 10
Mn	mg/L	< 5	5 - 10	10 - 50	> 50
B	mg/L	< 0.2	0.2 - 0.5	0.5 - 1	> 1
S	mg/L	< 12	12 - 20	20 - 50	> 50
MO	%	< 2	2 - 5	5 - 10	> 10
RELACIONES CATIONICAS		Ca/Mg	Ca/K	Mg/K	(Ca+Mg)/K
		2-5	5-25	2.5-15	10-40

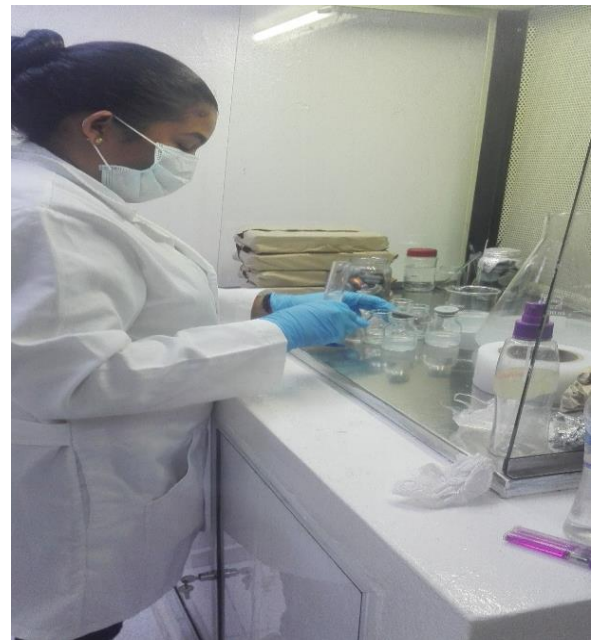
Anexo I. Espectrofotómetro genesys 20.



Anexo J. Sustancias utilizadas para las pruebas bioquímicas.



Anexo K. Imágenes realizando diferentes procedimientos del proyecto de grado.



Anexo L. Cronograma de actividades para el desarrollo del proyecto de investigación.

TIEMPO (MESES) ACTIVIDAD	ENERO				FEBRERO				MARZO			
	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4
ENCUESTAS												
DELIMITACIÓN ZONA DE ESTUDIO												
TOMA DE MUESTRA												
ANALISIS DE LABORATORIO												
ANALISIS DE RESULTADOS DE LABORATORIOS												
REDACCIÓN FINAL DE LA INVESTIGACIÓN												

Anexo M. Tabla de presupuesto requerido para el desarrollo del proyecto de investigación.

PRESUPUESTO					
EVALUACIÓN DE BACTERIAS DIAZOTROFICAS (Azotobacter sp y Azospirillum sp) EN LA RIZOSFERA DE CINCO FINCAS AFECTADAS POR LOS PESTICIDAS UTILIZADOS PARA EL CULTIVO DE ALGODÓN EN BOSCONIA CESAR.					
RUBROS		UND	CANTIDAD	ALOR UNITARIO	VALOR TOTAL
ITEM	DESCRIPCIÓN				
1	INSTRUMENTOS DE LABORATORIO				838,000
1.1	Cajas de petri de vidrio	UND	30	6,000	180,000
1.2	Frasco de agar agar	UND	1	250,000	250,000
1.3	Frasco de vidrio 300 ml	UND	30	3,500	105,000
1.4	Caja de guantes quirurgicos	UND	1	15,000	15,000
1.5	Caja de tapabocas	UND	1	13,000	13,000
1.6	Rollos de papel aluminio	UND	2	2,500	5,000
1.7	Rollo de cinta de enmascrar	UND	3	2,500	7,500
1.8	Rollo de papel kraft	UND	1	25,000	25,000
1.9	Beaker de 500 ml	UND	5	20,000	100,000
2	Pipetas de 10 ml	UND	2	15,000	30,000
2.1	Tubos de ensayo	UND	20	3,000	60,000
2.2	Estiletes punta fina	UND	5	1,500	7,500
2.3	Batas de laboratorio	UND	2	6,000	12,000
2.4	Caja lamina cubre y portaobjetos	UND	100	280	28,000
3	ALQUILER DE EQUIPOS				640,000
3.1	Horno	UND	1	85,000	85,000
3.2	Balanza	UND	1	45,000	45,000
3.3	Microscopio	UND	1	130,000	130,000
3.4	Macroscopio	UND	1	130,000	130,000
3.5	Espectofotometro	UND	1	150,000	150,000
3.6	Nevera	UND	1	70,000	70,000
3.7	Peachimetro	UND	1	30,000	30,000
4	GASTOS DE PERSONAL				280,000
4.1	Viaticos	Global	2	50,000	100,000
4.2	Papeleria	Global	Global	180,000	180,000
SUBTOTAL					1,758,000
IMPREVISTOS 3%					52,740
COSTO TOTAL					1,810,740

Anexo N. Encuestas realizadas a los propietarios de las fincas.



Universidad Popular Del Cesar

Encuesta a propietarios o administradores de fincas del municipio de Bosconia-Cesar

Objetivo: Identificar las fincas afectadas por el uso de pesticidas en cultivo de algodón del municipio de Bosconia – Cesar.

Nombre de la finca: Las Mercedes

Nombre del propietario o administrador: Luis Eduardo De la Hoz

1. ¿Qué clase de cultivos ha tenido en su finca?

Algodón, Ganadería

2. ¿Tubo usted el cultivo de algodón? Si o No

Si

3. ¿En qué año sembró algodón?

1987

4. ¿Cuántas hectáreas de algodón tuvo en su finca?

25 hectáreas

5. ¿Para qué era usado su cultivo de algodón? ¿le daba un uso comercial o personal?

arrende para el cultivo de algodón

6. ¿Su economía estaba basada gracias a los cultivos de algodón?

No

7. ¿El algodón fue un producto rentable? Si o No

Si

Estudiantes quienes realizan la encuesta:
Erland Cantillo Martínez.
Luisa Hernandez Andrade.

8. ¿Durante cuantos años tuvo usted el cultivo de algodón?

10 años

9. ¿En la bonanza algodонера existió algún tipo seguro agrario?

No

10. ¿Usaba productos químicos? ¿Sí o No?

Si

11. ¿Qué clase de productos usaba?

Metil, paratium, garmate, btim.

12. ¿Dónde compraba los productos químicos utilizados?

Desmotadora

13. ¿Luego de la bonanza algodонера, dejó los terrenos de los cultivos abandonados? ¿Sí o No?

Si

14. ¿Fue fácil utilizar nuevamente esos terrenos para otros cultivos? ¿Sí o No?

No

15. ¿Hubo recuperación del suelo de forma natural? ¿Sí o No?

Estudiantes quienes realizan la encuesta:
Erland Cantillo Martínez.
Luisa Hernandez Andrade.

Si

16. ¿Realizo actividades para la recuperación del suelo? ¿Sí o No?

No

17. ¿Qué actividades realizo?

18. ¿Cuánto tiempo demoro la recuperación del suelo?

Años

19. ¿Qué impactos evidencio por la bonanza algodonera?

Erosión

20. ¿El agua utilizada para el riego de dónde provenía?

Agua lluvia

21. ¿Cuáles fueron las plagas?

picudo

22. ¿Cuáles eran las plagas que más afectaban a los cultivos?

picudo

Estudiantes quienes realizan la encuesta:
Erland Cantillo Martínez.
Luisa Hernandez Andrade.



UNIVERSIDAD
Popular del Cesar

23. ¿Cuál era el tiempo de acción de los pesticidas?

entre 24 horas y 48 horas

24. ¿Presento o escucho de algún problema en la salud por el uso de pesticidas?

No.

25. ¿Alguna vez un producto químico daño su cultivo? ¿Sí o No? ¿De qué manera?

No.

26. ¿Cree usted que al usar agroquímicos causa efectos negativos al medio ambiente?

27. ¿Se vio afectada su economía al momento que la bonanza algodonera termino?

Estudiantes quienes realizan la encuesta:
Erland Cantillo Martínez.
Luisa Hernandez Andrade.

Anexo O. Trabajo de campo de la investigación



