

ESCUELA POLITÉCNICA NACIONAL

FACULTAD DE INGENIERÍA QUÍMICA Y AGROINDUSTRIA

EFFECTO DE LA INOCULACIÓN CON *Azotobacter* sp. EN EL CRECIMIENTO DE PLANTAS INJERTADAS DE CACAO (*Theobroma cacao*), GENOTIPO NACIONAL, EN LA PROVINCIA DE ESMERALDAS

**PROYECTO PREVIO A LA OBTENCIÓN DEL TÍTULO DE INGENIERO
AGROINDUSTRIAL**

JUAN JOSÉ EGAS YEROVI
juanjoseegas@yahoo.com

DIRECTOR: ING. JOSÉ SERGIO VELÁSQUEZ CARRERA
jvcvelasquez@hotmail.com
CODIRECTOR: DR. JUAN PATRICIO CASTILLO DOMÍNGUEZ
pesd@yahoo.com

Quito, julio 2010

© Escuela Politécnica Nacional 2010
Reservados todos los derechos de reproducción

DECLARACIÓN

Yo, Juan José Egas Yerovi, declaro que el trabajo aquí descrito es de mi autoría; que no ha sido previamente presentado para ningún grado o calificación profesional; y, que he consultado las referencias bibliográficas que se incluyen en este documento.

La Escuela Politécnica Nacional puede hacer uso de los derechos correspondientes a este trabajo, según lo establecido por la Ley de Propiedad Intelectual, por su Reglamento y por la normativa institucional vigente.

Juan José Egas Yerovi

CERTIFICACIÓN

Certificamos que el presente trabajo fue desarrollado por Juan José Egas Yerovi bajo nuestra supervisión.

Ing. José Velásquez
DIRECTOR DE PROYECTO

Dr. Patricio Castillo
CODIRECTOR DEL PROYECTO

ÍNDICE DE CONTENIDOS

	PÁGINA
RESUMEN	vii
INTRODUCCIÓN	ix
GLOSARIO DE TÉRMINOS	xii
1. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	1
1.1. Características agronómicas del cultivo de cacao genotipo Nacional	1
1.1.1. Clasificación taxonómica del cacao	1
1.1.2. Generalidades del cultivo de cacao	1
1.1.3. Grupos genéticos del cacao	4
1.1.4. Requerimientos agroecológicos del cacao	8
1.1.5. Manejo del cultivo de cacao	10
1.2. Formas convencionales de fertilización de los suelos destinados a la plantación de cacao	14
1.3. Características biológicas y proceso de fijación de nitrógeno de la bacteria <i>Azotobacter</i>	16
1.3.1. Clasificación taxonómica de <i>Azotobacter</i>	16
1.3.2. Características del género <i>Azotobacter</i>	16
1.3.3. Fijación de nitrógeno atmosférico por <i>Azotobacter</i>	19
1.3.4. La nitrogenasa	21
1.3.5. Mecanismo de fijación biológica de nitrógeno	23
1.3.6. Formas de protección del complejo nitrogenasa frente al oxígeno	26
1.4. Uso de <i>Azotobacter</i> como bio-fertilizante	27
2 MATERIALES Y MÉTODOS	30
2.1. Materiales	30
2.2. Propagación de las bacterias nitrificantes	31
2.3. Inoculación de las bacterias nitrificantes	34
2.4. Estudio del efecto de las dosis sobre los principales caracteres morfológicos de las plantas	36
2.5. Estudio del análisis de nitrógeno foliar realizado a las plantas	37
2.6. Determinación de la dosis óptima de <i>Azotobacter</i> sp.	38
2.7. Análisis financiero de los tratamientos	38

3.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	41
3.1.	Propagación de <i>Azotobacter</i> sp.	41
3.2.	Altura de planta a los 112 días después de la primera inoculación	42
3.3.	Diámetro del cuello del tallo de planta a los 112 días después de la primera inoculación	46
3.4.	Número de hojas a los 112 días después de la primera inoculación	48
3.5.	Área foliar a los 112 días después de la primera inoculación	53
3.6.	Nitrógeno total a los 112 días después de la primera inoculación	57
3.7.	Determinación de la dosis óptima de la bacteria <i>Azotobacter</i> sp.	61
3.8.	Análisis financiero del uso de la dosis óptima	64
4.	CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	67
4.1.	Conclusiones	67
4.2.	Recomendaciones	68
	BIBLIOGRAFÍA	69
	ANEXOS	75

ÍNDICE DE TABLAS

		PÁGINA
Tabla 1.1.	Géneros representativos de microorganismos implicados en la fijación de nitrógeno asimbiótica, asociativa y simbiótica.	21
Tabla 2.1.	Tratamientos, tipos de fertilización y concentraciones aplicadas en el experimento.	34
Tabla 2.2.	Volumen de fertilizante o biofertilizante inoculado a cada planta en los días destinados a las labores de fertilización, en ml.	35
Tabla 3.1.	Altura de la planta, en cm, a los 112 días después de iniciado el estudio.	42
Tabla 3.2.	Rangos múltiples para altura de la planta, en cm, a los 112 días después de iniciado el estudio, por tratamientos.	44
Tabla 3.3.	Rangos múltiples para diámetro de tallo, en cm, a los 112 días después de iniciado el estudio, por tratamientos.	46
Tabla 3.4.	Número de hojas a los 112 días después de iniciado el estudio.	48
Tabla 3.5.	Rangos múltiples para número de hojas a los 112 días después de iniciado el estudio, por tratamientos.	50
Tabla 3.6.	Área foliar de las plantas de cacao, en cm ² , a los 112 días después de iniciado el estudio.	53
Tabla 3.7.	Rangos múltiples para área foliar de las plantas, en cm ² , a los 112 días después de iniciado el estudio, por tratamientos.	54
Tabla 3.8.	Nitrógeno total fijado, en g N/ha, a los 112 días después de iniciado el estudio.	57
Tabla 3.9.	Rangos múltiples para nitrógeno total fijado, en g N/ha, a los 112 días después de iniciado el estudio, por tratamientos.	58
Tabla 3.10.	Resumen de resultados obtenidos por cada tratamiento, en cada variable, a los 112 días de iniciado el estudio.	61
Tabla 3.11.	Análisis financiero para vivero de cacao (100 000 plantas), desde injertación hasta trasplante, usando <i>Azotobacter</i> sp. como fuente de fertilización.	64
Tabla 3.12.	Análisis financiero para vivero de cacao (100 000 plantas), desde injertación hasta trasplante, usando fertilizante foliar de composición	

13-40-13 (13% nitrógeno, 40% fósforo, 13% potasio) más elementos menores quelatados como fuente de fertilización.

ÍNDICE DE FIGURAS

		PÁGINA
Figura 1.1.	Planta adulta de cacao y sus partes	2
Figura 1.2.	Mazorca de cacao criollo	4
Figura 1.3.	Mazorca de cacao forastero	5
Figura 1.4.	Mazorca de cacao trinitario	6
Figura 1.5.	Mazorca de cacao genotipo nacional	7
Figura 1.6.	Célula vegetativa de <i>Azotobacter vinelandii</i>	17
Figura 1.7.	Célula quística de <i>Azotobacter</i> sp.	18
Figura 1.8.	Complejo enzimático nitrogenasa	22
Figura 1.9.	Representación esquemática del ciclo de fijación biológica de nitrógeno por acción del complejo nitrogenasa	24
Figura 3.1.	Promedios de altura de la planta, con los intervalos al 95% de confianza, en cm, a los 112 días después de iniciado el estudio.	43
Figura 3.2.	Promedios de diámetro de cuello del tallo con los intervalos al 95% de confianza, en cm, a los 112 días después de iniciado el estudio.	47
Figura 3.3.	Promedios de número de hojas a los 112 días después de iniciado el estudio, con los intervalos al 95% de confianza.	49
Figura 3.4.	Promedios de área foliar de las plantas, con los intervalos al 95% de confianza, en cm ² , a los 112 días después de iniciado el estudio.	55
Figura 3.5.	Promedios de nitrógeno total fijado, con los intervalos al 95% de confianza, en g N/ha, a los 112 días después de iniciado el estudio.	59

ÍNDICE DE ANEXOS

	PÁGINA
ANEXO I	
Ubicación del Vivero. Cantón Quinindé – Provincia de Esmeraldas	75
ANEXO II	
Composición del medio de cultivo Ashby	76
ANEXO III	
Distribución de bloques (tratamientos y repeticiones) en el lugar de estudio	77
ANEXO IV.	
Cálculos para realizar cada inoculación de <i>Azotobacter</i> sp.	78
ANEXO V	
Resultados del análisis de nitrógeno total, realizado en la Estación Experimental “Santa Catalina” del INIAP	83
ANEXO VI	
Fotografías del proceso de aislamiento de <i>Azotobacter</i> en laboratorio	84
ANEXO VII	
Presentación del biofertilizante después de la propagación	86
ANEXO VIII	
Vivero de cacao, área donde se realizó el experimento y disposición de los tratamientos	87

RESUMEN

El objetivo del presente trabajo fue determinar el efecto de la inoculación con *Azotobacter* sp. en el desarrollo de plantas injertadas de cacao (*Theobroma cacao*), genotipo nacional, de dos meses de edad, en un vivero de cacao situado en el sector de Quindé, provincia de Esmeraldas.

Para lograrlo, se inocularon en el suelo de plantas injertadas de cacao, diferentes dosis de dos cepas distintas de la bacteria fijadora de nitrógeno *Azotobacter* sp. (cepa comercial y cepa nativa de la zona donde se realizó el experimento), en intervalos de 28 días, para observar la respuesta de las plantas en su crecimiento.

Se midió el efecto de esta bacteria en los principales caracteres morfológicos de las plantas: altura, diámetro de tallo, número de hojas, área foliar, así como en la cantidad de nitrógeno fijada al suelo, calculada a partir de un análisis de nitrógeno foliar, al término de cuatro meses de ensayo. Se comparó el crecimiento de las plantas de los diferentes tratamientos con el obtenido en plantas tratadas con fertilización química convencional, y con plantas sin ningún tipo de fertilización.

Se encontró que las plantas inoculadas con *Azotobacter* sp. como única fuente de fertilización desarrollaron un promedio de altura de plantas similar al de las plantas tratadas con fertilización química convencional, incluso con la concentración más baja, de 10^5 UFC/mL. Los tratamientos con las diferentes dosis de la bacteria no desarrollaron diferencias significativas respecto de los otros tratamientos en las variables diámetro de tallo, número de hojas y área foliar. Así mismo, se determinó que la fijación de nitrógeno al suelo por la bacteria fue significativamente mayor respecto de la fertilización química y del testigo, a partir de la concentración 10^6 UFC/mL.

Por estas razones, se estableció que la dosis óptima para la fertilización de plantas injertadas de cacao genotipo nacional con *Azotobacter* sp. fue la de concentración 10^6 UFC/mL, correspondiente a la recomendación del proveedor de

la cepa. Con dicha concentración, se calculó un costo unitario similar al de la fertilización química, con un beneficio ecológico de disminución del consumo de agroquímicos.

INTRODUCCIÓN

El cultivo de cacao (*Theobroma cacao* L.) constituye una de las más valiosas opciones productivas de la provincia de Esmeraldas, por el aumento de la demanda en el mercado exterior, unido a las buenas perspectivas de incremento de precio en dicho mercado. Según proyecciones de la Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación FAO (2004), se prevé un crecimiento en el consumo mundial de cacao de alrededor del 2,1% anual para el año 2010, respecto al consumo de cacao registrado durante el período de 1988-2000.

Los datos recolectados por la International Cocoa Organization (2009 b) indican una clara tendencia al alza en el precio del cacao, puesto que el valor promedio por tonelada en el mes de enero del 2009 fue de USD 1 624,28; mientras que, el precio promedio para el mes de julio del mismo año fue de USD 2 791,35.

Además, el auge de los mercados de productos orgánicos en las últimas décadas apunta a que cada vez se comercialice más cacao con certificación orgánica, con un precio mayor al del cacao cultivado convencionalmente. De igual manera, el apareamiento de gremios de productores de cacao orgánico genera la necesidad de transferir tecnologías más limpias y prácticas de fertilización, control de plagas y enfermedades, y actividades culturales más amigables con el ambiente.

La necesidad de reducir el consumo de fertilizantes químicos, debido a las exigencias ambientales de los países que compran productos agrícolas, obliga a realizar investigaciones encausadas en el desarrollo de alternativas como los biofertilizantes. Entre ellas, el empleo de *Azotobacter*, una bacteria que no tiene dependencia simbiótica con las plantas y que fija nitrógeno, representa una de las opciones más viables en torno a la fertilización de los cultivos con nitrógeno, que es un nutriente esencial para el crecimiento y producción.

Según Delgado *et al.* (2003), las alternativas nutricionales de las plantas, de aplicación práctica no procedentes de la industria química datan del siglo XVII, de las cuales se destaca la producción de biofertilizantes. En la actualidad se ha retornado a esta práctica como una gran opción para lograr producciones sanas y económicas.

La producción y uso de biofertilizantes tiene un efecto positivo, tanto a nivel ambiental como económico, de una manera sostenible. Una de las razones por las que se ha generado un mayor interés por la agricultura orgánica, es que el uso excesivo de agroquímicos y la realización de técnicas incorrectas de preparación y cultivos, han reducido drásticamente la vida de los suelos, su estructura y su fertilidad (Delgado *et al.*, 2003).

En determinadas condiciones ambientales, el efecto beneficioso de las bacterias nitrificantes y fijadoras de nitrógeno se debe a la presencia de sustancias fisiológicamente activas que ellas son capaces de sintetizar como tiamina, ácido nicotínico, ácido pantoténico y otras vitaminas capaces de estimular la germinación de las semillas y el crecimiento y desarrollo de algunas especies vegetales (Delgado *et al.*, 2003). En un estudio realizado por García *et al.* (2005), se comprobó que bacterias como *Azotobacter* mejoran la capacidad de absorción de nitrógeno en trigo, debido a que transforman los exudados de la raíz en sustancias promotoras del crecimiento vegetal, a tal punto que las semillas inoculadas con la bacteria y fertilizadas con el 50% de la dosis recomendada de nitrógeno, alcanzaron un desarrollo similar al de semillas sin inocular y con la dosis recomendada de nitrógeno.

En el presente estudio se analiza el efecto de la aplicación de *Azotobacter* sp. en el crecimiento de plantas de vivero de cacao genotipo nacional, desde la injertación de las plántulas, hasta el momento de trasplante. Para esto, se evalúa el efecto de diferentes concentraciones del biofertilizante en las plantas, a través de la medición de los principales caracteres morfológicos de la planta (altura de la planta, diámetro del cuello del tallo, número de hojas y área foliar), así como la cantidad de nitrógeno absorbido por las plantas, y consecuentemente, el

nitrógeno fijado por la bacteria en el suelo. Estos parámetros son comparados con un testigo local, que tiene fertilización química convencional, y con un testigo absoluto, sin ningún tipo de fertilización.

Además, se establece el costo de la utilización de la bacteria como biofertilizante y su impacto en los costos de producción de plantas de cacao, de un vivero de la provincia de Esmeraldas, respecto a los costos de producción con fertilización química convencional.

GLOSARIO DE TÉRMINOS

Bacterias pleomórficas: Son bacterias que presentan dos o más formas estructurales durante su ciclo de vida.

Biofertilizantes: Son preparaciones que contienen microorganismos que existen naturalmente en los suelos agrícolas, pero que han sido seleccionados o modificados genéticamente para mejorar el rendimiento y/o la calidad de los cultivos.

Diazótrofos: Son organismos que pueden usar el nitrógeno atmosférico como su única fuente para la síntesis de sus compuestos en los que necesitan nitrógeno.

Flagelos peritricos: Son flagelos que se ubican alrededor de todo el perímetro de la célula, de manera regular.

Genotipo: Es el conjunto de genes que contiene un organismo, heredados de sus progenitores. En organismos *diploides*, la mitad de los genes se heredan del padre y la otra mitad de la madre.

Injertación: Es un método de reproducción asexual y artificial de las plantas, en el que una porción de tejido procedente de una planta, llamada injerto, se une sobre otra ya asentada, denominada patrón, de tal modo que el conjunto de ambos crezca como un solo organismo.

Inoculación: Para el caso de biofertilizantes, es la acción de introducir artificialmente en el suelo microorganismos con una concentración determinada, para que actúen sobre las plantas y el suelo.

Nitrogenasa: Es el complejo enzimático responsable de la conversión de nitrógeno atmosférico en amoníaco, formado por dos componentes proteicos.

Organismos poliploides: Son organismos que poseen tres o más juegos completos de cromosomas de la misma o distintas especies o con dos o más genomas de especies distintas.

Requerimientos Agroecológicos: Son las necesidades de un cultivo, a nivel de clima y suelo, para poder crecer adecuadamente.

Tres bolillo: Sistema de distanciamiento entre plantas de un cultivo determinado, en el que dichas plantas forman grupos de triángulos equiláteros entre hileras.

1. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

1.1. CARACTERÍSTICAS AGRONÓMICAS DEL CULTIVO DE CACAO GENOTIPO NACIONAL

1.1.1. CLASIFICACIÓN TAXONÓMICA DEL CACAO

Universal Taxonomic Services (2008) ubica a la planta de cacao dentro de la siguiente clasificación taxonómica:

Dominio:	Eukaryota
Reino:	Plantae
Phylum:	Magnoliophyta
Clase:	Magnoliopsida
Orden:	Malvales
Familia:	Sterculiaceae
Género:	<i>Theobroma</i>
Especie:	<i>Theobroma cacao</i>

1.1.2. GENERALIDADES DEL CULTIVO DE CACAO

Theobroma cacao pertenece a la familia de las esterculiáceas. El árbol del cacao puede llegar hasta una altura de 10 m. Los botones florales aparecen en viejas axilas foliares, en el tronco y en las ramas (cauliflora). El árbol puede florecer durante todo el año, siempre que en el curso del año no existan períodos de sequía prolongados o variaciones de temperatura muy marcadas. Las frutas de baya se desarrollan, de las flores, entre 5 a 6 meses. Las flores aparecen generalmente al principio de la época de lluvia y son polinizadas por insectos. La forma de la fruta del cacao es similar a la del pepino, tiene aproximadamente 25 cm de largo, de 8 a 10 cm de diámetro y pesa entre 300 y 400 g. La cáscara

carnosa, de 20 mm de grosor, cubre la pulpa gelatinosa y agridulce que contiene un alto contenido de azúcar. La fruta contiene entre 25 y 50 semillas en forma de almendra, tienen sabor amargo y están dispuestas en 5 u 8 filas oblongas (Ministerio de Agricultura, Ganadería, Acuacultura y Pesca del Ecuador, 2006).

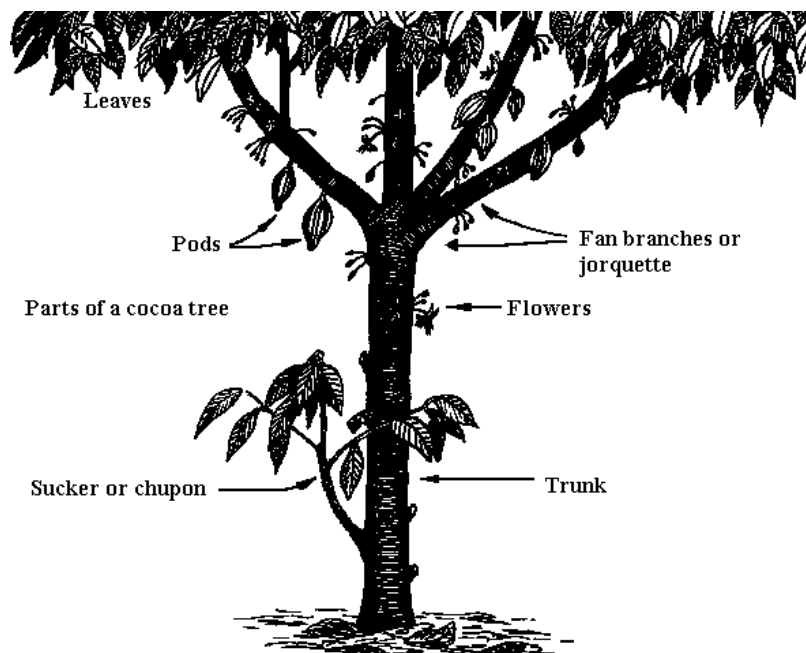


Figura 1.1. Planta adulta de cacao y sus partes (Sutherland, 2009)

El cacao es una planta originaria de los trópicos húmedos de América del Sur. El lugar donde dicha especie pudo haberse formado fue la zona alta amazónica, al noroeste de América del Sur (Enríquez, 2004).

Actualmente, el cacao como producto con fines económicos es cultivado en la mayoría de países tropicales. Es un cultivo de trópico húmedo, entre las latitudes 15° Norte y 15° Sur de la línea ecuatorial. Se encuentra excepcionalmente, hasta en latitudes subtropicales de 23° Norte y 25° Sur, por lo que se establecen en promedio, límites de hasta los 20° Norte y 20° Sur (Ministerio de Agricultura de Perú, 2004; Flores, 2008; Enríquez, 2004).

Según el Ministerio de Agricultura y Ganadería del Ecuador (2001), en el país las plantaciones comerciales de cacao se ubican principalmente en la región litoral

del país, en una franja altitudinal que va desde el nivel del mar hasta los 500 metros sobre el nivel del mar. Enríquez (2004), no obstante, indica que en el Ecuador existen condiciones relativamente buenas para el cultivo hasta los 1300 metros sobre el nivel del mar, según las condiciones climáticas y de suelo.

Se han determinado tres regiones o zonas características de cultivo de cacao en el Ecuador (Ministerio de Agricultura y Ganadería del Ecuador, 2001), que de acuerdo con las condiciones agroclimáticas y geográficas se dividen en norte, centro y sur.

La zona norte comprende las provincias de Esmeraldas, Manabí, las estribaciones occidentales de la cordillera de los Andes en las provincias de Pichincha y Cotopaxi; esta zona posee suelos en su mayor parte de origen volcánico y precipitaciones promedio de 2000 mm anuales, concentrados en un período lluvioso de diciembre a abril.

La zona centro comprende la parte norte de la cuenca del río Guayas y la provincia de Los Ríos, con suelos fértiles y profundos y precipitaciones promedio de 1000 mm anuales, distribuidas entre los meses de diciembre a julio. El cacao proveniente de esta zona se conoce comercialmente como “arriba”, y presenta las mejores características organolépticas en el mundo.

La zona sur corresponde a la parte sur de la provincia del Guayas y la provincia de El Oro, con una precipitación pluvial en un rango de 500 a 1000 mm anuales y con suelos de buenas características para el cultivo. Las condiciones climáticas en esta zona son menos propicias para el desarrollo de enfermedades.

Además de las zonas típicas de cultivo de cacao mencionadas anteriormente, existen plantaciones de este producto en las estribaciones de la Cordillera Occidental de las provincias de Bolívar, Chimborazo, Cañar y Azuay y en toda la región amazónica.

1.1.3. GRUPOS GENÉTICOS DEL CACAO

El cacao presenta tres grandes grupos genéticos: los criollos, los forasteros y los trinitarios.

Enríquez (2004), indica que el cacao criollo se dispersó desde México y América Central hacia el resto del mundo. Este es un cacao de sabor muy agradable y de alta calidad, que se procesa en las fábricas de chocolate para obtener un producto exclusivo. El cacao criollo presenta una gran susceptibilidad a las enfermedades, es el cacao más delicado y de poca productividad, por lo que ha ido desapareciendo con el tiempo.

El mismo autor sostiene que la palabra “criollo” no debe confundirse con un término de localidad, puesto que es un grupo genético con características propias, en las que no ha intervenido la ubicación geográfica.

Este grupo genético presenta un árbol pequeño y más susceptible a plagas y enfermedades, follaje menos denso, mazorcas grandes con 5 surcos definidos más profundos, verrugosos, con o sin depresión en el cuello y puntas agudas, de color verde y rojo cuando la mazorca es inmadura, que se torna a amarillo y rojo oscuro, cuando la mazorca es madura, tal como se muestra en la figura 1.2. Presenta semillas blancas a ligeramente rosadas en el momento de la cosecha, y adquieren un color canela cuando han atravesado el proceso de fermentación y secado (Rodríguez, 2006). El cacao criollo produce, generalmente, almendras de tamaño mediano con cotiledones claros que presentan un delicado aroma de chocolate acompañado por un sabor de nuez suave (ANECACAO, 2009).



Figura 1.2. Mazorca de cacao criollo (Gregory, 2009)

Según Enríquez (2004), el cacao forastero es un complejo genético muy grande y no bien definido. Dentro de este grupo están las plantas de cacao provenientes del río Amazonas y las estribaciones de la cordillera oriental de los Andes en Venezuela, Colombia, Ecuador, Perú y Bolivia. Las plantas pertenecientes a este grupo genético son más corrientes y de menor calidad que las de los grupos genéticos criollo y trinitario, con excepción del cacao genotipo nacional de Ecuador (ANECACAO, 2009; International Cocoa Organization, 2009 a).

El cacao forastero es un árbol muy vigoroso, con follaje grande e intenso, más tolerante a las enfermedades. Como se muestra en la figura 1.3, las mazorcas son amelonadas, con 10 surcos superficiales o profundos; presentan cáscaras lisas a ligeramente verrugosas y extremos redondeados en el fruto; su color es verde cuando son inmaduras, y cambian su tonalidad a amarillo cuando están maduras. Los cotiledones son morados, de forma triangular, aplanadas y muy astringentes (Rodríguez, 2006). El grupo genético denominado forastero produce almendras de tamaño mediano a pequeño con cotiledones marrones oscuros y tiene un aroma a chocolate fuerte y un sabor amargo (ANECACAO, 2009).



Figura 1.3. Mazorca de cacao forastero (Gregory, 2009)

En cambio, el cacao trinitario se obtuvo a partir de la mezcla del criollo con el forastero, por tanto, existen diferentes grados de cruzamiento y de calidad; aunque, por lo general, este cacao es considerado bueno y entra en los parámetros de cacao fino y de aroma (ANECACAO, 2009; International Cocoa Organization, 2009 a). Dentro de este grupo genético se ubica la variedad de cacao CCN-51, que es producto de la investigación realizada en el Ecuador; presenta características de alta producción y tolerancia a las enfermedades, pero

no tiene el aroma que posee el cacao genotipo nacional. (Ministerio de Agricultura y Ganadería del Ecuador, 2001)

En el grupo genético trinitario, el árbol presenta gran vigor híbrido, con altas producciones resistentes a varios agentes adversos. Las mazorcas han adquirido gran variabilidad unos de otros, desde parecidos a los criollos hasta a los forasteros, con una amplia gama de colores superficiales. Una mazorca de cacao trinitario se muestra en la figura 1.4. El cacao trinitario produce almendras de tamaño mediano a grande, con cotiledones marrones rojizos y desarrolla un aroma a chocolate pronunciado, con un sabor adicional, descrito como frutal (ANECACAO, 2009).



Figura 1.4. Mazorca de cacao trinitario (Gregory, 2009)

Se ha descubierto un genotipo propio del Ecuador, que es considerado un cacao fino y de aroma debido a sus características. Este cacao es denominado “nacional”, da un chocolate suave, de buen sabor y un aroma a chocolate delicado, acompañado por un pronunciado sabor floral (ANECACAO, 2009; Enríquez, 2004).

Tradicionalmente, se conoce al cacao ecuatoriano como “cacao de arriba”, debido a que el cacao de mejor calidad que se empezó a exportar desde el puerto de Guayaquil se cultivaba en la zona donde nace el río Guayas (río arriba); la denominación “arriba” se convirtió en sinónimo de buen sabor y aroma (Ministerio de Agricultura y Ganadería del Ecuador, 2001).

El cacao genotipo nacional, que se produce únicamente en el Ecuador, ha sido clasificado como del tipo forastero, puesto que posee algunas características

fenotípicas de este, pero la diferencia con respecto a este grupo genético radica en que el cacao genotipo nacional posee un sabor y aroma característicos, que son muy apreciados por las industrias de todo el mundo (Ministerio de Agricultura y Ganadería del Ecuador, 2001).

ANECACAO (2009), indica que el cacao genotipo nacional es de un tipo forastero, pero autóctono del bosque húmedo ecuatoriano. Sin embargo, algunos estudios han demostrado que las plantas pertenecientes a este genotipo tienen mayores semejanzas genéticas y morfológicas con el cacao criollo (Enríquez, 2004). Estudios posteriores en el ámbito genético deberán comprobar las semejanzas del genotipo nacional con los grupos genéticos establecidos. Se observa la forma de la mazorca del cacao genotipo nacional en la figura 1.5.

Según información de ANECACAO (2009), el cacao genotipo nacional produce almendras de gran tamaño con cotiledones ligeramente marrones, que desarrollan el sabor de denominación “Arriba” cuando atraviesan un buen proceso de fermentación y secado.



Figura 1.5. Mazorca de cacao genotipo nacional (INIAP, 2006)

El cacao genotipo nacional se ha mezclado, a través del tiempo, con variedades introducidas al país desde la década de los años 1920, de cacaos forasteros y

trinitarios, con la finalidad de mejorar la resistencia a plagas y enfermedades (Enríquez, 2004; ANECACAO, 2009). Con esto, el sabor “Arriba”, típico del cacao genotipo nacional, se ha diluido en el tiempo; a esto se suma la mezcla de los granos de este genotipo de cacao con granos de variedades como la CCN-51 en las actividades de cosecha, fermentación, secado y comercialización. Estos factores han determinado la imposición de castigos a los exportadores ecuatorianos de este producto, y la calificación al país como exportador de cacao fino de aroma ha bajado (International Cocoa Organization, 2008).

1.1.4. REQUERIMIENTOS AGROECOLÓGICOS DEL CACAO

a) Pluviosidad

Es vital para el desarrollo y producción de una plantación de cacao, ya que incide sobre la actividad fisiológica de la planta. Es un factor que se debe considerar para establecer una huerta de cacao. El requerimiento de agua para este cultivo oscila entre 1200 y 2400 mm de precipitaciones (según la ubicación de la plantación), repartidos durante los 12 meses del año, con un mínimo mensual de 100 a 120 mm de agua (Ministerio de Agricultura y Ganadería del Ecuador, 2001). Los períodos de lluvias menores a 100 mm mensuales no deben sobrepasar los 3 meses (International Cocoa Organization, 2009 a). En zonas donde las precipitaciones son mayores a 2500 mm de agua anuales, el cultivo de cacao debe establecerse en suelos con buen drenaje (Ministerio de Agricultura de Perú, 2004).

b) Luz

La radiación solar influye en el crecimiento y fructificación de la planta de cacao. En las zonas productivas del país es necesario el brillo solar en cantidad de 800 a 1000 horas/año (Ministerio de Agricultura y Ganadería del Ecuador, 2001). Se conoce que el grado de luz que debe recibir una plantación de cacao está en relación a la disponibilidad de agua y nutrientes presentes en el suelo. Se ha encontrado que a menor sombra, mayores serán los requerimientos de abonos orgánicos y de cuidados

fitosanitarios, y que a menor edad del cultivo, más necesaria se hace la presencia de sombra, sobre todo en los primeros tres años del cultivo (Enríquez, 2004).

c) Viento

Es el factor que determina la velocidad de evapotranspiración del agua en la superficie del suelo y de la planta. En las plantaciones expuestas continuamente a vientos fuertes se produce la defoliación o caída prematura de hojas (Ministerio de Agricultura de Perú, 2004). En plantaciones donde la velocidad del viento es del orden de 4 m/s, y con muy poca sombra, es frecuente observar defoliaciones fuertes. En zonas con presencia de vientos fuertes, es necesaria la siembra de barreras rompevientos y de sombras temporales y definitivas, para reducir la evapotranspiración (Enríquez, 2004).

d) Temperatura

La temperatura media anual óptima para el cultivo del cacao es de 25 °C; bajo los 22 °C la floración se inhibe, y con temperaturas menores, los frutos tardan en madurar. La temperatura del suelo, para una buena conservación de la materia orgánica, no debe ser superior a los 25 °C (Ministerio de Agricultura y Ganadería del Ecuador, 2001). La temperatura máxima que soporta el cultivo de cacao es de 32 °C, mientras que, la temperatura mínima es de 21 °C (International Cocoa Organization, 2009 a).

e) Suelo

Es uno de los elementos básicos para el establecimiento y crecimiento de una plantación de cacao (Flores, 2008). Un suelo apto para el cultivo de cacao debe tener una estructura de franco a franco arcilloso y franco arenoso, con profundidad mínima de 1 m, que permita el desarrollo radicular y la absorción de agua, con buena retención de agua y drenaje adecuado de ser el caso; el cacao se desarrolla mejor en suelos provistos de materia orgánica, por lo cual la distribución de hojarasca y cascarones

de mazorcas sanas dentro de la plantación es una buena práctica (Ministerio de Agricultura y Ganadería del Ecuador, 2001). Además, el cacao crece mejor en sitios con poca pendiente, que no sobrepase el 30%. El nivel aceptable de pH para el cacao es de 5,5 a 7,0; el rango óptimo es de 6,0 a 6,5. A niveles de pH muy ácidos o alcalinos (4,5 y 8,5), la producción de cacao es muy deficiente, por lo que se necesita aplicar correctivos. Los suelos más apropiados para la siembra de cacao en el país son los bancos de los ríos, de los cuales se han realizado muchos estudios (Enríquez, 2004).

1.1.5. MANEJO DEL CULTIVO DE CACAO

El manejo del cultivo de cacao se refiere a todas las actividades que se deben realizar en una plantación para obtener buenos rendimientos en la cosecha y garantizar la sostenibilidad de la producción en el tiempo. Dichas actividades han sido descritas por el Ministerio de Agricultura y Ganadería del Ecuador (2001), en su guía de cultivo.

La preparación del terreno se efectúa con la finalidad de que las plántulas de cacao tengan las condiciones adecuadas para realizar el trasplante, y asegurar su crecimiento. Consta de las siguientes actividades:

1. Deshierbe, donde se eliminan las malas hierbas y restos de cultivos anteriores.
2. Alineada, donde se establecen los sitios donde se sembrará cada planta de cacao y de sombra; usualmente se utiliza una cuerda marcada y equipos de medición de longitud.
3. Huequeada, donde se realizan agujeros en el suelo por medio de una pala o azadón.
4. Siembra de sombra provisional, que usualmente son plantas de banano o plátano. Estas plantas, además de servir de sombra para el cacao en sus primeros años, son una fuente de ingreso para los productores, ya que

obtienen rentas por la venta de estos productos mientras el cacao llega a su etapa de producción.

5. Siembra de sombra definitiva, con plantas como guabo, frutales, árboles maderables, entre otras.

La siembra de las plantas de cacao se realiza durante los primeros meses de la época lluviosa, usando plantas de 5 a 6 meses de edad. El sistema de distanciamiento entre plantas utilizado en el Ecuador es de 3 x 4 m ó 4 x 4 m, en escuadra o en tres bolillo (Ministerio de Agricultura y Ganadería del Ecuador, 2001).

La incidencia de malezas puede ocasionar la reducción en la capacidad nutritiva; estas plantas sirven de hospedero de agentes causantes de enfermedades y plagas. Su control se realiza tres veces al año mediante dos métodos, mecánico (uso de machetes); y químico (aplicación de herbicidas). Una combinación de los dos métodos puede ser lo más conveniente, aunque la presencia de sombra y la incorporación de residuos vegetales inhiben el crecimiento de malezas (Flores, 2008).

El control de enfermedades en el cacao es muy importante para la obtención de buenos rendimientos en la cosecha y para el mantenimiento de la sanidad dentro de las plantaciones. El cacao, al igual que cualquier vegetal, es susceptible a la acción de microorganismos que alteran su desarrollo, y en nuestro país es una de las principales causas para la baja productividad (Ministerio de Agricultura y Ganadería del Ecuador, 2001).

Según Enríquez (2004), las principales enfermedades que afectan al cacao en el Ecuador son de origen fúngico, y son:

1. Escoba de bruja, producida por *Crinipellis perniciososa*
2. Moliniasis, causada por *Moniliophthora roreri*
3. Mal del machete, producido por *Ceratocystis fubriata*
4. Pudrición parda, ocasionada por *Phytophthora palmivora*.

Su incidencia depende del manejo de la plantación y el control debe estar dirigido a contrarrestar las condiciones que favorecen el desarrollo de los patógenos. Para el establecimiento de una plantación sana de cacao se deben considerar las siguientes recomendaciones (Ministerio de Agricultura y Ganadería del Ecuador, 2001; Enríquez, 2004):

1. Utilizar material de siembra tolerante a las enfermedades.
2. Ubicar los cultivos en zonas donde las condiciones climáticas favorecen al desarrollo del cacao y no del patógeno.
3. Evitar daños mecánicos.
4. Regular la sombra permanente, evitar el exceso.
5. Realizar podas fitosanitarias continuas.

La poda de las plantas de cacao es la práctica que permite dar al árbol una estructura vegetativa balanceada, mediante la eliminación de ramas que permitan al árbol una buena formación, penetración de luz solar y buena ventilación que estimula la emisión de brotes, flores y frutos (Ministerio de Agricultura de Perú, 2004). Los tipos de poda más usuales son los siguientes:

1. Poda de formación: Da la forma definitiva a la plantas; se realiza de acuerdo al material de siembra, sea éste híbrido o clon.
2. Poda de mantenimiento: Se realiza anualmente, eliminando las ramas en exceso para dar luz y aire al follaje. No se realiza cuando existe floración o fructificación.
3. Poda fitosanitaria: Es la eliminación de las partes de la planta afectadas por enfermedades.
4. Poda de rehabilitación: Se realiza en huertos viejos e improductivos; se elimina abundante follaje y ramas o chupones basales.
5. Recepa del árbol: Se corta íntegramente el árbol a una altura de 0,40m del suelo y se efectúa en aquellos árboles de edad avanzada.

Luego de cada poda se deben proteger las heridas para evitar el ingreso de patógenos que causan enfermedades. Los productos más aconsejables para la aplicación son pasta bordelesa y alquitrán vegetal (Flores, 2008).

El riego es una labor importante en el proceso productivo del cacao; la aplicación depende de las condiciones climáticas y de las propiedades físicas del suelo. Se debe evitar el estancamiento o riego excesivo, que puede ocasionar el desarrollo de enfermedades o asfixiar las raíces. La aplicación del agua de riego puede realizarse por zanjas o canales, tuberías y aspersores, aunque esta última no es tan recomendable en sitios con presencia de enfermedades como la moniliasis (Enríquez, 2004).

En cuanto a la rehabilitación de huertas, Enríquez (2004) indica que es la aplicación de conocimientos orgánicos, fenológicos y genéticos que permitan aumentar la producción de las huertas que tienen un potencial productivo, que por un manejo insuficiente no pueden generar mejor producción. En nuestro país es necesario rehabilitar el 30% de las huertas. El mismo autor señala que las labores de rehabilitación son:

1. Sanidad, que es la remoción (poda) de las partes enfermas o su control.
2. Control de altura de los árboles; deben tener una altura máxima de 4 m.
3. Reducción de sombra, pues el exceso de árboles de sombra dentro de una plantación ocasiona el desarrollo de enfermedades y una baja producción; los árboles de sombra deben ser de capa alta y abierta.
4. Resiembra, cuya finalidad es llenar espacios libres, debe efectuarse cuando existan las condiciones adecuadas para la nueva siembra; la falta de cobertura provoca la evaporación del agua y la destrucción de la materia orgánica.

La edad avanzada de las plantaciones o cuando de cacaotal los árboles no responden al proceso de rehabilitación, constituyen factores para realizar una renovación, es decir eliminación de las plantas para proceder a sembrar un nuevo material productivo (Flores, 2008). La renovación, según la edad o el grado de

reducción de la producción se realiza, o con la renovación del cacao solamente y conservando la sombra definitiva, o con la renovación del cacao y de la sombra a la vez.

1.2. FORMAS CONVENCIONALES DE FERTILIZACIÓN DE LOS SUELOS DESTINADOS A LA PLANTACIÓN DE CACAO

La aplicación de fertilizantes en el cultivo de cacao debe realizarse con base en los resultados de un análisis de suelo o un análisis foliar. Con los resultados se establece la fertilidad actual y el estado nutricional de la planta.” (Ministerio de Agricultura y Ganadería del Ecuador, 2001)

Se ha estimado que se necesitan cerca de 200 kg de nitrógeno, 25 kg de fósforo, 300 kg de potasio y 140 kg de calcio por hectárea, para obtener un crecimiento óptimo del cultivo de cacao, desde el trasplante hasta el inicio de la producción de mazorcas (Lemin, 2005).

La extracción de nutrientes de una cosecha de cacao seco de 1000 kg/ha por año es de aproximadamente 44 kg de nitrógeno (como nitrato), 10 kg de fósforo (como P_2O_5) y 77 kg de potasio (como K_2O); en el caso de abrir las mazorcas del cacao dentro del campo y esparcir las cáscaras en el suelo durante la cosecha de los granos, se devuelve al suelo aproximadamente 2 kg de nitrógeno, 5 kg de fósforo y 24 kg de potasio, lo cual debe tenerse en cuenta para el cálculo de las necesidades de fertilizante (Enríquez, 2004; Ministerio de Agricultura, Ganadería, Acuacultura y Pesca del Ecuador, 2006; Flores, 2008). Adicionalmente, Urquhart (1963) señala una especial importancia del manejo del azufre, calcio y magnesio en las prácticas de fertilización de los suelos destinados al cultivo de cacao.

Editorial Continental (1982), señala que las necesidades de fertilizantes del cacao no deben considerarse independientemente de las plantas que provean de sombra al cultivo. En algunos experimentos, la aplicación de fertilizantes con presencia de sombra densa no tuvo una respuesta favorable al crecimiento de

cacao, por tanto, si se considera la aplicación de fertilizantes, debe estar en función de la cantidad de sombra que tiene el cultivo. Esto es complementado por Enríquez (2004), que indica que la calidad y cantidad de los abonos y fertilizantes a utilizarse debe estar calculada, también, de acuerdo con los requerimientos nutricionales de las plantas asociadas al cultivo de cacao, sobre todo los de sombra, por lo que se sugiere que se debe adicionar un 50% del nutriente que va a utilizar el cultivo asociado.

Se han establecido recomendaciones generales de fertilización de los suelos destinados al cultivo de cacao; se sugiere que la fórmula de fertilización 60-90-60 o el compuesto 12-12-12 se aplique en los hoyos, previo a la siembra de las plantas de cacao, en cantidades de 50 a 60 g por planta. Después del primer año de producción de las plantas, la aplicación de dichos fertilizantes se incrementa al rango de 80 a 100 g por planta y por año, hasta el cuarto año de producción. Posteriormente se aplica la formulación 100-140-100 con 180 a 200 g por planta cada año hasta que el árbol de cacao cumpla su ciclo productivo (Ministerio de Agricultura de Perú, 2004; Flores, 2008).

Editorial Continental (1982) recomienda utilizar al momento del trasplante fertilizantes compuestos de fórmulas como 6-5-6, 10-5-10 o similares, en dosis de 100 a 200 g divididos en 3 ó 4 aplicaciones durante el primer año del cultivo. Del segundo al cuarto año de estancia del cacao en el campo, la dosis recomendada es desde 0,6 a 1,0 kg por planta, que se incrementan cada año, gradualmente. Esta actividad se debe realizar conjuntamente con la eliminación de la sombra temporal, ya que el aprovechamiento del nitrógeno inorgánico es mejor con baja presencia de sombra.

Actualmente, las recomendaciones para nutrir a los cultivos de cacao van encaminadas a mantener una cubierta vegetal que provea de materia orgánica al suelo, la asociación con cultivos como leguminosas y la aplicación de abonos orgánicos y biofertilizantes (Enríquez, 2004).

1.3. CARACTERÍSTICAS BIOLÓGICAS Y PROCESO DE FIJACIÓN DE NITRÓGENO DE LA BACTERIA *AZOTOBACTER*

1.3.1. CLASIFICACIÓN TAXONÓMICA DE *AZOTOBACTER*

Joint Genome Institute (2009) y Uniprot Consortium (2009) ubican a las bacterias del género *Azotobacter* dentro de la siguiente clasificación taxonómica:

Dominio:	Bacteria
Phylum:	Proteobacteria
Clase:	Gammaproteobacteria
Orden:	Pseudomonadales
Familia:	Pseudomonadaceae
Género:	<i>Azotobacter</i>
Especies:	<i>A. vinelandii</i> , <i>A. chroococcum</i> , <i>A. beijerinckii</i>

1.3.2. CARACTERÍSTICAS DEL GÉNERO *AZOTOBACTER*

Azotobacter es un género de bacterias de vida libre y que fijan nitrógeno atmosférico, que pertenece a la clase Gammaproteobacteria. Este género ha sido estudiado por más de cien años, por científicos de todo el mundo. *A. vinelandii* fue el organismo de experimentación de muchos investigadores durante la emergencia de la bioquímica como una disciplina dominante en las ciencias de la vida (Setubal, 2009).

Estas son bacterias de vida libre que crecen adecuadamente en medios sin nitrógeno. Utilizan el nitrógeno atmosférico para la síntesis de sus proteínas celulares. La proteína celular se mineraliza después de la muerte de la célula, por tanto, contribuye a la disponibilidad de nitrógeno para las plantas silvestres y los cultivos agrícolas (Agronet Software Pvt. Ltd., 2004).

Espín (2002) indica que las bacterias del género *Azotobacter* son bacterias Gram-negativas, que tienen una pared celular compleja, compuesta por una membrana externa y una capa interna de peptidoglicano, que contiene ácido murámico y mureína.

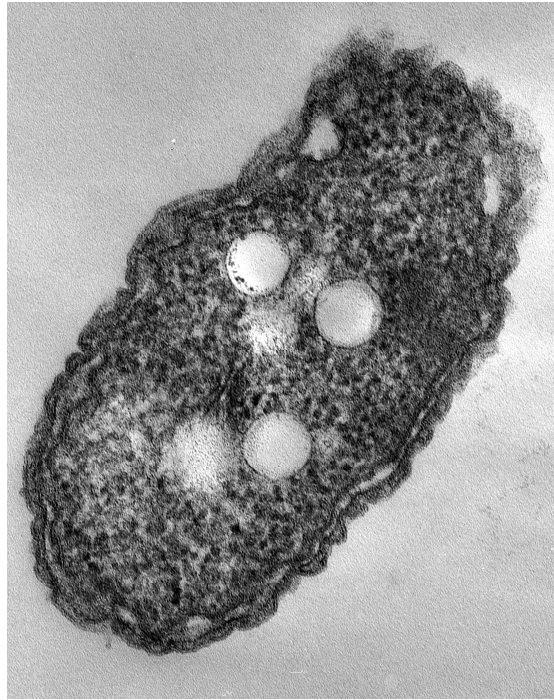


Figura 1.6. Célula vegetativa de *Azotobacter vinelandii* (Brantley, 2008)

Las especies del género *Azotobacter* son células ovoides y grandes de 1,5 a 2,0 μm de diámetro, que viven generalmente en suelos y aguas frescas. Son bacterias pleomórficas, cuya morfología varía desde bacilos hasta células en forma de cocos. Se las observa como células individuales, como pares, en agregados irregulares y algunas veces cadenas de tamaño variable (Espín, 2002).

Algunas especies como *A. vinelandii* y *A. chroococum* sufren un proceso de diferenciación para formar quistes resistentes a la desecación. Se mueven por flagelos peritricos; son aerobios, pero pueden crecer en concentraciones de oxígeno bajas. Algunas cepas producen pigmentos solubles o insolubles en agua (Espín, 2002).

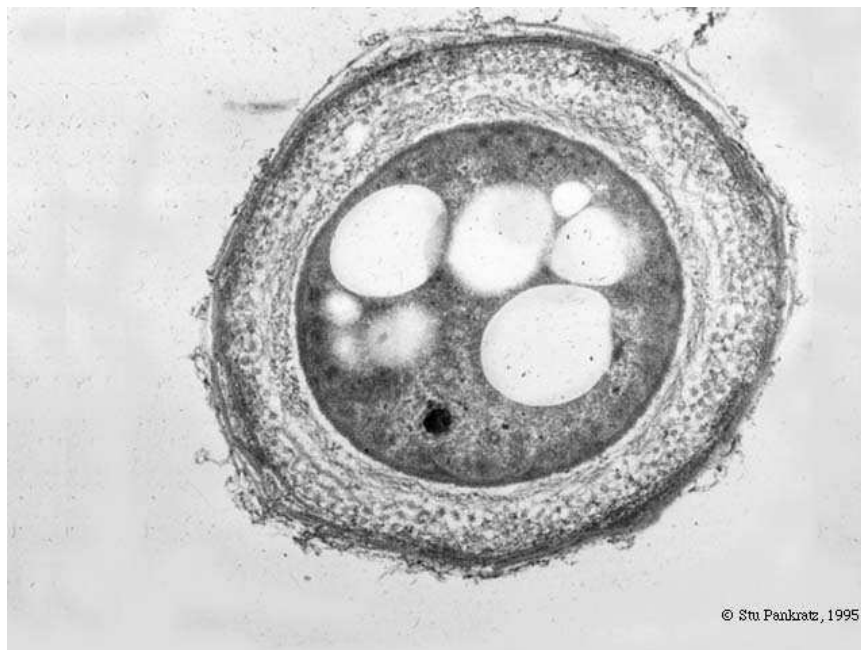


Figura 1.7. Célula quística de *Azotobacter* sp. (Pankratz, 1995)

Espín (2002) indica que las bacterias del género *Azotobacter* son quimioorganotróficas, es decir, que utilizan azúcares, alcoholes y sales inorgánicas para crecer. Utilizan nitrato y sales de amonio y ciertos aminoácidos como fuentes de nitrógeno. Responden positivamente al reactivo catalasa.

El rango de pH en el que crecen en presencia de nitrógeno combinado es de 4,8 a 8,5; el pH óptimo para crecer cuando fijan nitrógeno es de 7,0 a 7,5. Según Garassini (1967), la presencia de *Azotobacter* en el suelo está relacionada directamente con el pH del mismo, pues no se desarrollan en medios con valores por debajo de 6,0.

Garassini (1967) también señala que la cantidad de ciertos elementos minerales, la abundancia de materia orgánica, la presencia de elementos antagónicos, la aireación, la humedad, la temperatura, entre otros factores, son condiciones reguladoras de estas bacterias en el suelo. *Azotobacter* crece en suelos bien aireados y a temperaturas entre 25 y 35 °C, lo que la califica como una bacteria mesófila, que Mayea *et al.* (1998) ubican en 30 °C la temperatura óptima para el

crecimiento; pero que se puede desarrollar entre 10 y 40 °C y a pH entre 7,0 y 8,0.

Por otro lado, Sylvia *et al.* (2005) establecen que una de las limitantes en la fijación de nitrógeno por parte de bacterias de vida libre, es el rango reducido de temperatura en el cual la nitrogenasa, que es la enzima que cataliza la fijación de nitrógeno, tiene actividad catalítica. Entre 5 y 10 °C, la actividad de la nitrogenasa es baja, mientras que en los límites superiores de 37 a 40 °C, la enzima pierde su actividad por su sensibilidad al calor.

Autores como Agronet Software Pvt. Ltd. (2004), Bernal *et al.* (2000) y Delgado *et al.* (2003), indican que las bacterias del género *Azotobacter*, además de fijar nitrógeno atmosférico en el suelo, sintetizan algunas sustancias como tiamina (vitamina B-1), ácido nicotínico, ácido pantoténico, riboflavina y otras hormonas vegetales capaces de estimular la germinación de las semillas y el crecimiento y desarrollo de algunas especies vegetales.

Algunas especies del género *Azotobacter*, como *Azotobacter vinelandii*, son poliploides, poseen hasta 80 copias de su cromosoma. Esta puede ser la razón de su gran tamaño respecto a otras bacterias, como *Escherichia coli*. Espín (2002) y Setubal (2009) realizaron algunas aseveraciones al respecto y han señalado a esta característica como una razón importante para el estudio de esta bacteria en el ámbito de la genética.

1.3.3. FIJACIÓN DE NITRÓGENO ATMOSFÉRICO POR AZOTOBACTER

Sylvia *et al.* (2005) aseguran que después de la fotosíntesis, la fijación biológica de nitrógeno, que consiste en la reducción del nitrógeno atmosférico a dos moléculas de amoníaco, es el segundo proceso biológico más importante en el planeta Tierra. Weaver *et al.* (1994) señalan que la fijación biológica de nitrógeno asume una gran significancia en los sistemas naturales y agrícolas en vista de la escasez y costo en aumento de los fertilizantes inorgánicos.

Haaker (1988) señala que la fijación de nitrógeno ha sido aplicada en la agricultura por largo tiempo. Los romanos notaron que las leguminosas tienen la habilidad de enriquecer los suelos, que luego, en el siglo XIX, se estableció que era por acción de bacterias del género *Rhizobium*. Por esta razón desarrollaron el concepto de rotación de cultivos en la que las leguminosas tienen un papel esencial. Hoy en día, la rotación de cultivos es una herramienta importante en el manejo de los suelos y la renovación de los nutrientes.

Sergei Winogradsky, quien fue uno de los primeros investigadores en realizar trabajos y descubrimientos en el tema de la fijación biológica de nitrógeno, mencionó en el año 1895 que en la naturaleza hay una enorme reserva de materia orgánica pobre en nitrógeno, y concluyó que la única manera de que aquel carbono orgánico pueda tener su ciclo en la naturaleza es con la existencia de microorganismos capaces de fijar el nitrógeno libre (Sylvia *et al.*, 2005).

Los microorganismos fijadores de nitrógeno atmosférico pueden existir como organismos de vida libre o también en asociaciones de diferentes grados de complejidad con otros microorganismos, plantas y animales, como lo describen Coyne (2000); Mayea *et al.* (1998) y Garassini (1967), y como se muestra en la tabla 1.1.

Los microorganismos fijadores de nitrógeno y que no dependen simbióticamente de otros organismos están ampliamente distribuidos en casi todos los nichos ecológicos. Su distribución está en relación con su gran diversidad bioquímica, taxonómica y ecológica, como lo señalan Weaver *et al.* (1994). Los organismos que pueden usar el nitrógeno atmosférico como su única fuente para la síntesis de sus compuestos en los que necesitan nitrógeno se llaman diazótrofos (diazó = dos átomos de nitrógeno).

Los diazótrofos están presentes en una amplia variedad de hábitats, como organismos de vida libre en suelos y aguas, en asociación con pastos, en asociaciones simbióticas en los intestinos de termitas y en simbiosis con las raíces de leguminosas (Dixon y Kahn, 2004).

Tabla 1.1. Géneros representativos de microorganismos implicados en la fijación de nitrógeno asimbiótica, asociativa y simbiótica.

Grupo Fisiológico	Tipo de Asociación	Dependencia al Oxígeno	Género representativo
Heterótrofo	Asimbiótica	Aerobio	<i>Azotobacter</i>
			<i>Azotomonas</i>
			<i>Azotococcus</i>
			<i>Beijerinckia</i>
			<i>Derxia</i>
		Anaerobio facultativo	<i>Pseudomonas</i>
			<i>Xanthobacter</i>
			<i>Azospirillum</i>
			<i>Bacillus</i>
			<i>Klebsiella</i>
Heterótrofo	Asociativa	Anaerobio	<i>Thiobacillus</i>
			<i>Clostridium</i>
			<i>Desulfovibrio</i>
			<i>Desulfotomaculum</i>
			<i>Methanobacillus</i>
		Anaerobio facultativo	<i>Agrobacterium</i>
			<i>Azospirillum</i>
			<i>Azotobacter</i>
			<i>Bacillus</i>
			<i>Beijerinckia</i>
Heterótrofo	Simbiótica	Aerobio	<i>Enterobacter</i>
			<i>Klebsiella</i>
			<i>Bradyrhizobium</i>
			<i>Rhizobium</i>
			<i>Frankia</i>
Autótrofo	Asimbiótica	Aerobio	<i>Nostoc</i>
			<i>Gloeocarpa</i>
			<i>Trichodesmium</i>
			<i>Anabaena</i>
			<i>Calothrix</i>
		Anaerobio	<i>Nostoc</i>
			<i>Rhodospirillum</i>
			<i>Rhodopseudomonas</i>
			<i>Chromatium</i>
			<i>Chlorobium</i>
Autótrofo	Simbiótica		<i>Nostoc</i>
			<i>Halosiphon</i>
			<i>Anabaena</i>

(Coyne, 2000)

1.3.4. LA NITROGENASA

Todos estos organismos tienen en común el ser procariontes, que contienen el complejo enzimático nitrogenasa, responsable de la conversión de nitrógeno atmosférico en amoníaco (Sylvia *et al.*, 2005). El complejo nitrogenasa está formado por dos componentes protéicos, que deben su nombre a su composición

metálica. La proteína que contiene hierro y molibdeno es la dinitrogenasa (con abreviatura MoFe), mientras que la proteína que contiene solamente hierro se denomina dinitrogenasa reductasa (con abreviatura Fe).

Haaker (1988) establece que la dinitrogenasa reductasa (Fe) es una proteína dimérica con una masa molecular de 63 kDa y contiene un grupo prostético de cuatro átomos de hierro y cuatro de azufre (4Fe-4S) como sitio activo redox. Además, Dixon y Kahn (2004) muestran que el sitio activo mencionado es el responsable de unir las dos subunidades del dímero, y que al estar expuesto al medio externo es el que le confiere una gran sensibilidad hacia el oxígeno. La función de esta proteína es la de reducir a la proteína dinitrogenasa (MoFe).

En cambio, la dinitrogenasa (MoFe) es una proteína tetramérica de 230 kDa, compuesta por dos tipos de subunidades de 55 y 60 kDa. Contiene molibdeno y hierro, este último en dos sitios activos redox. Los sitios activos de la dinitrogenasa (MoFe) son el cofactor FeMo, que es el sitio de reducción del sustrato y contiene molibdeno, hierro, azufre y homocitrato; y el sitio P, que contiene ocho átomos de hierro y siete de azufre. Esta enzima tiene contacto con el nitrógeno atmosférico y lo reduce a amoníaco (Dixon y Kahn, 2004).

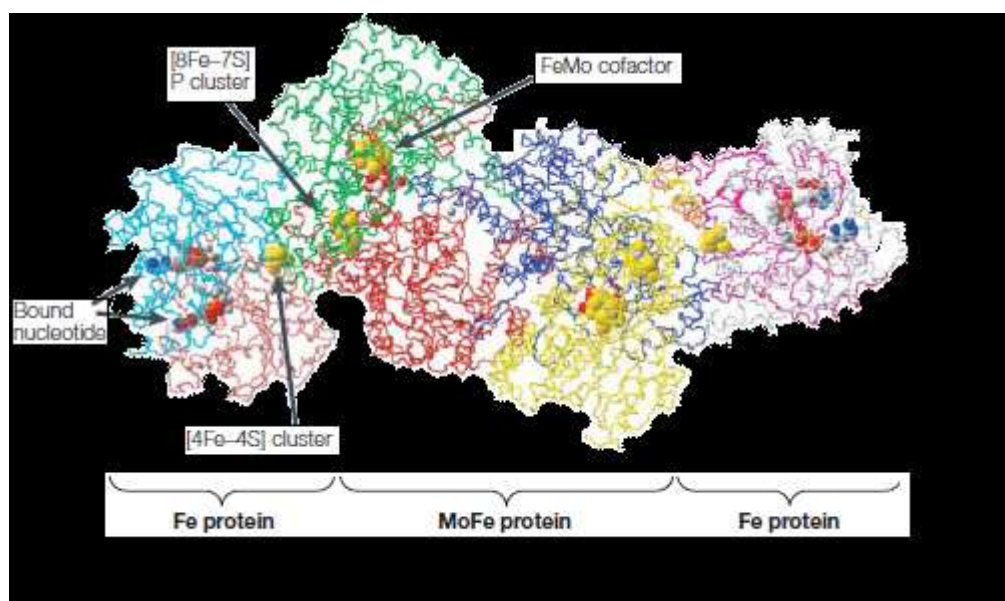


Figura 1.8. Complejo enzimático nitrogenasa (Dixon y Kahn 2004)

Se ha determinado que existen otras formas alternativas a la dinitrogenasa (Dixon y Kahn, 2004; Sylvia *et al.*, 2005). Algunas cepas de *Azotobacter vinelandii* tienen la capacidad de sintetizar dinitrogenasas con cofactores de vanadio y hierro, o de hierro y hierro, ante la falta de molibdeno en el sustrato.

Así, las principales características del complejo enzimático nitrogenasa son descritas por Sylvia *et al.* (2005):

1. Consiste de dos proteínas, la proteína dinitrogenasa (MoFe) y la proteína dinitrogenasa reductasa (Fe),
2. Se destruye por acción del oxígeno,
3. Contiene hierro y molibdeno o vanadio,
4. Necesita iones de magnesio (Mg^{2+}) para activarse,
5. Convierte ATP a ADP,
6. Es inhibida por ADP,
7. Reduce nitrógeno atmosférico y otras moléculas pequeñas con triple enlace, y
8. Reduce H^+ a H_2 , incluso cuando el nitrógeno atmosférico está presente.

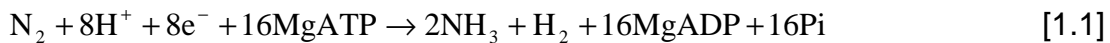
1.3.5. MECANISMO DE FIJACIÓN BIOLÓGICA DE NITRÓGENO

El mecanismo de fijación de nitrógeno es explicado por varios autores (Haaker, 1988; Dixon y Kahn, 2004; Sylvia *et al.*, 2005). Las etapas importantes de dicho mecanismo son las siguientes:

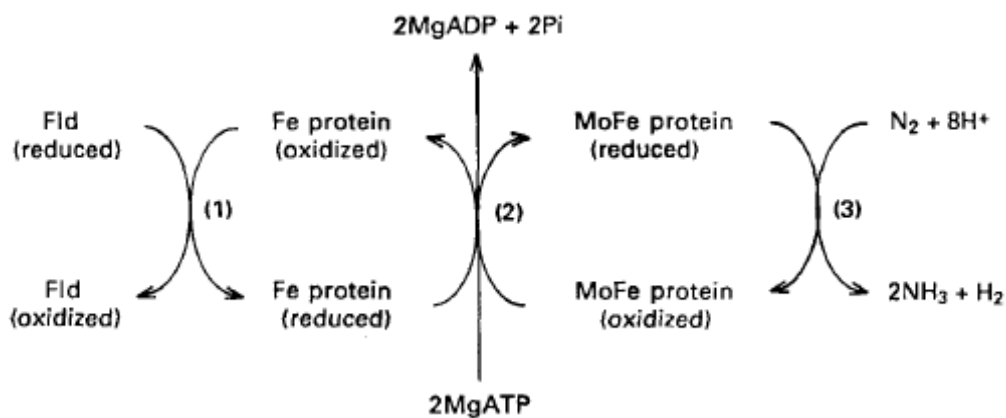
1. La dinitrogenasa reductasa (Fe) acepta electrones de un bajo donador redox, como la ferredoxina reducida o flavodoxina. Se une a dos moléculas de MgATP.
2. Luego, transfiere electrones, uno por cada ciclo, a la dinitrogenasa (MoFe).
3. La dinitrogenasa reductasa (Fe) y la dinitrogenasa (MoFe) forman el complejo nitrogenasa, el electrón es transferido. Dos moléculas de MgATP son hidrolizadas a dos moléculas de MgADP más dos fosfatos (P_i).

4. La dinitrogenasa reductasa (Fe) y la dinitrogenasa (MoFe) se disocian y el proceso se repite.
5. Cuando la dinitrogenasa (MoFe) ha obtenido el número suficiente de electrones, se une a una molécula de nitrógeno atmosférico, la reduce y forma una molécula de NH_4^+ , que luego de la formación de una segunda molécula, se dispone en forma de amoníaco e hidrógeno ($2\text{NH}_3 + \text{H}_2$).
6. Al final, todo el ciclo se repite.

La reacción [1.1] se deduce de la fijación biológica de nitrógeno:



La acción del complejo nitrogenasa en la fijación del nitrógeno atmosférico se explica mediante la figura 1.9:



Flid (reduced): Flavodoxina reducida.

Flid (oxidized): Flavodoxina oxidada.

Fe protein (oxidized): Proteína dinitrogenasa reductasa oxidada.

Fe protein (reduced): Proteína dinitrogenasa reductasa reducida.

MoFe protein (oxidized): dinitrogenasa oxidada.

MoFe protein (reduced): dinitrogenasa reducida.

Figura 1.9. Representación esquemática del ciclo de fijación biológica de nitrógeno por acción del complejo nitrogenasa (Haaker, 1988).

En la figura 1.9 se esquematiza el ciclo de fijación de nitrógeno en tres etapas: en la etapa (1), la dinitrogenasa reductasa (Fe protein) es reducida por la

Flavodoxina (Fld). En la etapa (2), la dinitrogenasa reductasa reducida forma el complejo nitrogenasa con la proteína dinitrogenasa (MoFe). Dos moléculas de MgATP se unen al complejo y son hidrolizadas a dos moléculas de MgADP y dos fosfatos (Pi). Al mismo tiempo, un electrón es transferido desde la dinitrogenasa reductasa a la proteína dinitrogenasa. Para la reducción de una molécula de N₂, que se lleva a cabo en la etapa (3), las etapas (1) y (2) deben ocurrir por lo menos 8 veces (Haaker, 1988).

Como se puede observar en la ecuación [1] y la figura 1.9, la fijación biológica de nitrógeno, al igual que la fijación química e industrial, gasta mucha energía. Estequiométricamente, la enzima necesita 16 moléculas de MgATP para transformar una molécula de nitrógeno atmosférico, en dos moléculas de amoníaco. Si se consideran las condiciones naturales y las ineficiencias de las bacterias, se necesitarían entre 20 y 30 moléculas de MgATP para la fijación biológica de nitrógeno (Sylvia *et al.*, 2005).

Al ser *Azotobacter* una bacteria heterótrofa, este género utiliza varias fuentes orgánicas de energía, que incluyen hemicelulosa, almidón, azúcares, alcoholes y ácidos orgánicos, que provienen de la materia orgánica presente en los suelos, desde los residuos vegetales de los cultivos y de las plantas silvestres, hasta raíces en descomposición y carbono proveniente de exudados radicales de plantas vivas. La tasa de fijación de nitrógeno, por cantidad de fuente de carbono consumido, oscila entre los 7 y 16 miligramos de nitrógeno atmosférico por gramo de fuente de energía consumida. Esto se traduce en cerca de 13 kilogramos de nitrógeno atmosférico fijado, por tonelada de fuente de carbono. La variación se da en términos de la cantidad de oxígeno presente (Sylvia *et al.*, 2005; García, 2003).

Espín (2002) sostiene que bacterias como *A. vinelandii* producen polihidroxitirato, que en ausencia de fuentes exógenas de carbono puede ser utilizado como una fuente de energía y carbono rápidamente oxidable, que es esencial para mantener una tasa respiratoria alta, que proteja a la nitrogenasa del oxígeno.

1.3.6. FORMAS DE PROTECCIÓN DEL COMPLEJO NITROGENASA FRENTE AL OXÍGENO

El complejo enzimático nitrogenasa es inactivado rápidamente por acción del oxígeno, de manera irreversible. Se ha llegado a determinar el tiempo de vida media de la enzima en presencia del aire. La dinitrogenasa reductasa (Fe) es la más sensible, con un tiempo de vida media de 45 segundos en contacto con el aire; mientras que la dinitrogenasa (MoFe) alcanza un tiempo de vida media de 10 minutos (Espín, 2002; Sylvia *et al.*, 2005). Al respecto, Coyne (2000) indica que ante este suceso se genera un dilema para *Azotobacter*, género de bacterias aerobias, puesto que el ingreso de oxígeno a la célula es necesario para producir electrones, tanto para la fijación como para la respiración. Existen diversos mecanismos que las bacterias del género *Azotobacter* han desarrollado para limitar la presencia de oxígeno dentro de la célula.

a) Protección conformacional

En *A. vinelandii* un aumento pasajero del oxígeno provoca un mecanismo de inactivación (switching-off) del complejo nitrogenasa, que consiste en la formación de un complejo nitrogenasa inactivado pero protegido, conocido como protección conformacional. Este complejo está formado por la unión no covalente de una proteína que contiene Fe-S a las proteínas dinitrogenasa reductasa (Fe) y la dinitrogenasa (MoFe). Cuando el organismo está expuesto al oxígeno, la fijación de nitrógeno se detiene abruptamente hasta el momento en que la concentración de oxígeno es más favorable, momento en el que la bacteria continúa la fijación de nitrógeno (Coyne, 2000).

b) Protección respiratoria

En algunas especies de *Azotobacter* se puede observar una forma exagerada de protección respiratoria. Este género exhibe una de las más altas tasas de respiración de todas las formas de vida (500 a 1000 cm³ de oxígeno por gramo de biomasa). La tasa respiratoria, en condiciones de fijación de nitrógeno atmosférico, es 10 veces más alta que la tasa normal

de muchas bacterias. Esto sirve para mantener el oxígeno alejado del complejo nitrogenasa, al consumir oxígeno tan rápido como este se difunde. Sin embargo, estudios recientes han puesto en duda la eficiencia de este tipo de protección del complejo nitrogenasa frente al oxígeno, puesto que se ha demostrado que el consumo de oxígeno por parte de *Azotobacter* está en función de la relación carbono-nitrógeno (C/N) del medio en que vive y está limitado por la concentración alta o baja de oxígeno en el ambiente; por esta razón se concluye que la tasa de difusión del oxígeno en la célula no es afectada significativamente por la respiración (Oelze, 2000).

c) **Autoprotección**

Si la concentración del complejo nitrogenasa es lo suficientemente alta frente a la concentración de oxígeno celular, la dinitrogenasa reductasa puede reducir oxígeno a H_2O_2 y posiblemente a H_2O y por lo tanto reduciría el O_2 en la vecindad de la nitrogenasa. Además el flujo constante de equivalentes reductores a través de la nitrogenasa puede ayudar a mantenerla en un estado reducido. Este proceso conocido como autoprotección requiere grandes cantidades de equivalentes reductores y ATP (Sylvia *et al.*, 2005).

d) **Limo**

Se ha observado la producción de polisacáridos extracelulares por parte de algunos diazótrofos, que protegen a las colonias del oxígeno al crear un microambiente anaerobio que limita la difusión del aire (Espín, 2002).

1.4. USO DE AZOTOBACTER COMO BIO-FERTILIZANTE

El uso de bacterias asimbióticas fijadoras de nitrógeno como biofertilizantes, se remonta a épocas anteriores al desarrollo de fertilizantes químicos, producto de la “revolución verde”. Con el auge de los fertilizantes nitrogenados esta práctica se redujo considerablemente, hasta que la inquietud mundial hacia el manejo

sustentable de los recursos naturales conllevó al desarrollo de actividades más amigables con el suelo, el agua y la biodiversidad de los cultivos agrícolas. Se dio paso a la agricultura orgánica, ecológica o limpia (Enríquez, 2004).

A partir del descubrimiento de la existencia de microorganismos fijadores de nitrógeno que no tenían relación simbiótica con las plantas, con Winogradsky en 1896, y con Beijerinck, en 1901, se realizaron una gran cantidad de estudios para determinar la capacidad de fijación de nitrógeno de estas especies (Olivares, 2008; Hernández y Chailloux, 2001). Así, se purificaron cepas con mayor potencial, se establecieron las formas de propagación de los microorganismos y se aplicaron en el campo, con buenos resultados.

Azotobacter es el microorganismo que ha sido utilizado en la agricultura de una forma más amplia frente a otros microorganismos benéficos. Las primeras aplicaciones de las bacterias de este género datan de 1902; su mayor uso se dio durante las décadas del 40, 50 y 60, particularmente en los países de Europa del Este (Ardila, 2006).

La aplicación práctica de la inoculación de este diazotrófo ha sido positiva. Ardila (2006) indica que se observaron notables incrementos en los rendimientos en diferentes cultivos, principalmente en cereales. Estos resultados obtenidos, no deben atribuirse exclusivamente a la ganancia de nitrógeno por las plantas, ya que estos microorganismos solubilizan fosfatos y sintetizan sustancias estimuladoras del crecimiento vegetal como tiamina, ácido nicotínico, ácido pantoténico, biotina, ácido indolacético (AIA), ácido giberélico y citoquininas, que intervienen directamente sobre el desarrollo de las plantas.

Además de los compuestos mencionados, el mismo autor señala que estos diazótrofos son capaces de sintetizar sustancias fungistáticas que, al inhibir el crecimiento de los hongos fitopatógenos del suelo, promueven indirectamente el desarrollo de las plantas, especialmente en las etapas tempranas del cultivo.

Delgado *et al.* (2003) demostraron que cepas de *Azotobacter*, purificadas de suelos cubanos, aceleraron el porcentaje de germinación de semillas de café (*Coffea arabica*) variedad Caturra Rojo, entre el 55 y el 62 %, a los primeros 50 días del tratamiento. También demostraron que plántulas de café inoculadas con dichas cepas alcanzaron a los siete meses de la inoculación, mayores valores morfológicos de altura, diámetro del tallo, pares de hojas, masa seca y área foliar, con relación a un testigo.

En el cultivo de trigo (*Triticum aestivum*) variedad Pavón, García *et al.* (2005) demostraron que tanto *Azospirillum* spp., como *Azotobacter beijerinckii* transformaron los exudados radicales, en sustancias promotoras del crecimiento vegetal, lo cual favoreció la absorción de urea en las raíces, al mismo tiempo que redujeron el consumo de urea en un 50%. La gramínea alcanzó un peso seco similar al del trigo fertilizado sólo con 100% de urea, sin inocular. Con esto, determinaron que bacterias como *Azotobacter* pueden ser una alternativa para la producción de trigo, con un esquema de ahorro de fertilizante nitrogenado, que permite mantener la fertilidad del suelo, sin causar contaminación ambiental.

Se ha reportado el beneficio del uso de biopreparados con base en *Azotobacter* al aportar del 30 al 50 % de las necesidades de nitrógeno de los cultivos, con un abaratamiento de la producción y la disminución de la contaminación ambiental, al disminuir el consumo de fertilizantes nitrogenados, que se filtran a las capas de agua subterránea y que contaminan los agroecosistemas (González *et al.*, 2001).

En el mercado se encuentran, actualmente, varios productos de diversas cepas de *Azotobacter*, en presentación líquida o sólida, con concentraciones entre 10^8 y 10^9 Unidades Formadoras de Colonia (UFC) por mililitro o gramo (ECOVAD, 2008; CCBOL GROUP SRL, 2008). La recomendación para aplicar este tipo de productos en los cultivos es de diluir el biofertilizante hasta una concentración de 10^6 UFC/mL, para que se aplique la solución directamente a los suelos, en aspersión o en riego por goteo, al momento del trasplante y un mes después, para mantener alta la población de *Azotobacter* y que ésta se pueda adaptar al suelo.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. MATERIALES

Los materiales utilizados en el presente estudio se indican a continuación:

- Cuerda.
- Pala.
- Azadón.
- Machete.
- Tijeras de jardinería.
- Zarán.
- Estacas de madera, de 50 cm de largo.
- Clavos metálicos, de 10 cm de largo.
- Fundas plásticas negras, para vivero, de dimensiones 15 cm x 20 cm.
- Suelo rico en materia orgánica, para las plantas de vivero.
- 270 plantas de cacao genotipo nacional, de 8 semanas de edad, injertadas en el día 56 de edad.
- Cajas mono petri.
- Ansa estéril.
- Agua destilada.
- Medio de cultivo agar Ashby.
- Pipetas graduadas de 1 mL, 10 mL, 50 mL y 100 mL.
- Agitador Barnstead Lab-line de 130 rpm.
- Bomba de vacío Gast de 60 PSI para aireación.
- Incubadora Memmert.
- Cepa pura C7 de *Azotobacter* sp., proveniente del banco de cepas del Laboratorio de Microbiología Agrícola de la Pontificia Universidad Católica del Ecuador y que se comercializa como biofertilizante. Cantidad: 1 litro, Concentración: 3×10^9 UFC/mL (Unidades Formadoras de Colonia por mililitro).

- Cepa nativa BPS de *Azotobacter* sp., proveniente de una muestra de suelo del sitio de la investigación, cantón Quinindé, aislada en el Laboratorio de Microbiología Agrícola de la Pontificia Universidad Católica del Ecuador, con medio de cultivo Ashby. Cantidad: 1 litro, Concentración: 5×10^{11} UFC/mL.
- Agua.
- Vaso medidor, con capacidad de 1 L y con medida desde 50 mL.
- Jeringuilla de 10 mL.
- Vasos desechables.
- Balde de agua de 10 L de capacidad.
- Cinta métrica rígida, de 8 m de alcance.
- Calibrador pie de rey de acero inoxidable PANTEC, con capacidad para medir desde 1 mm hasta 200 mm.
- Fungicida Cuproset Ultra, de aplicación por aspersión, concentración de 60 g por cada 20 L de agua.
- Bomba de fumigación de 20 L de capacidad.
- Fertilizante foliar Kristalon para inicio (13-40-13, más elementos menores quelatados), concentración 100 g por cada 20 L de agua.
- Insecticida Atakill, para eliminación de pulgones, concentración 30 g por cada 20 L de agua.

El experimento se realizó en un vivero de cacao, ubicado en la parroquia rural Malimpia, del cantón Quinindé, de la provincia de Esmeraldas. El vivero se encuentra a 233 m sobre el nivel del mar, con una temperatura promedio de 25 °C y con una precipitación anual media de 1800 mm de agua. Un mapa con la ubicación del vivero se muestra en el Anexo I.

2.2. PROPAGACIÓN DE LAS BACTERIAS NITRIFICANTES

El procedimiento de aislamiento de la bacteria *Azotobacter* sp., a partir de muestras de suelo del cantón Quinindé, provincia de Esmeraldas, para el

tratamiento 4, se realizó en el laboratorio de Microbiología Agrícola de la Pontificia Universidad Católica del Ecuador, de la siguiente manera:

1. Se recolectó una muestra compleja de suelo del vivero de cacao, donde se mezclaron pequeñas cantidades de suelo de distintos sitios y diferentes profundidades, hasta obtener 1 kg de muestra, que se trasladó en un recipiente hermético, protegido del calor y de la luz solar, hasta las instalaciones del Laboratorio de Microbiología Agrícola de la Pontificia Universidad Católica del Ecuador.
2. Se pesaron 100 g de la muestra de suelo, y se diluyeron en agua destilada, hasta obtener 1000 mL de una primera dilución de la muestra (10^{-1}).
3. Se tomaron 10 mL de la primera dilución y se mezclaron con agua destilada hasta obtener 100 mL de una segunda dilución (10^{-2}).
4. Se obtuvo una tercera dilución de 100 mL al mezclar 1 mL de la primera solución con agua destilada, hasta obtener el volumen deseado.
5. De cada dilución se tomó 1 mL, por medio de una pipeta graduada, y se depositó sobre una caja petri vacía y esterilizada. El proceso se repitió en 3 cajas petri diferentes, por cada dilución.
6. En cada caja petri inoculada con las muestras diluidas se vertió medio de cultivo agar Ashby en estado líquido a una temperatura entre 40 y 50 °C. Dicho medio es selectivo para *Azotobacter* sp., y su composición se muestra en detalle en el Anexo II.
7. Con el medio de cultivo todavía líquido, se agitaron las cajas sembradas, en todas las direcciones, para que la muestra diluida se homogenice en el medio.

8. Después de la solidificación del medio de cultivo, las cajas obtenidas fueron incubadas por 7 días a 28 °C boca abajo, luego de lo cual se seleccionaron las cajas en las que se presentó crecimiento de *Azotobacter* sp., en forma de colonias.
9. Por medio de un ansa estéril se rasparon las colonias representativas de cada caja y se sembraron nuevamente en cajas con el mismo medio Ashby, para su aislamiento.
10. Las nuevas cajas fueron incubadas a 28 °C por un tiempo de 48 horas con el fin de propiciar el crecimiento de colonias más puras de *Azotobacter* sp.
11. Las cepas aisladas y purificadas se mantuvieron por crío-conservación, para evitar cualquier contaminación potencial.

Posteriormente, se siguió el procedimiento para la propagación de las bacterias, tanto para la cepa comercial C7 como para la cepa nativa de Quinindé, según la metodología del Laboratorio de Microbiología Agrícola de la Pontificia Universidad Católica del Ecuador:

1. Las cepas aisladas, purificadas y conservadas se refrescaron y activaron en medio de cultivo Ashby con nitrógeno, por medio de siembra en superficie, a temperatura ambiente.
2. A partir de las cepas activadas, se prepararon 10 mL de pre-inóculo, por medio del raspado de la superficie de las cajas con bacterias activadas previamente, mediante un ansa estéril, y la introducción de la misma en un tubo de ensayo con 10 mL de caldo nutritivo de crecimiento (melaza, fosfatos, nitratos). Se mantuvo una agitación constante.
3. Se prepararon 100 mL de inóculo, a partir del pre-inóculo obtenido en el numeral anterior. Se colocaron 10 mL de pre-inóculo en 90 mL de caldo nutritivo de crecimiento. Después, se introdujo aire y agitación al medio.

4. El inóculo obtenido se mezcló con 900 mL de caldo nutritivo, para la fermentación de 1 L de biofertilizante, requerido para la aplicación en campo. Se mantuvo constante la aireación y agitación durante todo el proceso. El tiempo de fermentación duró aproximadamente 26 horas.
5. Se realizó una verificación de pureza de la mezcla final, con la medición de pH, el recuento en placa por siembra a profundidad, en medio Ashby, con nitrógeno y por último la prueba de coloración Gram.

2.3. INOCULACIÓN DE LAS BACTERIAS NITRIFICANTES

Previo a la primera inoculación con *Azotobacter* sp., se seleccionaron 270 plantas de cacao genotipo nacional más uniformes, con base en su vigorosidad y su tamaño, de 8 semanas de edad, con un diámetro de tallo de aproximadamente 1 cm, sin presencia de enfermedades o plagas, con una altura media de 30 cm, medida desde la base de la planta hasta la yema apical.

Se traspasaron las plantas seleccionadas al sitio destinado para el experimento, ubicado en un área alejada del resto de plantas del vivero, cubierta por un sarán para proteger a las plantas del sol. El área de estudio tuvo 8 m de largo por 4 m de ancho, estuvo dividida en 18 bloques, correspondientes a 6 tratamientos y 3 repeticiones, dispuestos completamente al azar (DBCA). Cada bloque tuvo 15 plantas injertadas de cacao, dichos bloques tuvieron una dimensión de 1 m por 1 m, con distanciamiento de 0,40 m entre tratamientos y 0,50 m entre repeticiones. Un esquema de la disposición de los bloques en el lugar de estudio se muestra en el Anexo III.

Los tratamientos fueron obtenidos con base en las recomendaciones del proveedor de la cepa y a las condiciones de crecimiento exponencial microbiano. De esta manera, se determinaron los siguientes tratamientos, que se muestran en la tabla 2.1.

Tabla 2.1. Tratamientos, tipos de fertilización y concentraciones aplicadas en el experimento

Nº Tratamiento	Tipo de Fertilización o Inoculación	Concentración
1	<i>Azotobacter</i> sp. cepa C7	10 ⁷ UFC/mL
2	<i>Azotobacter</i> sp. cepa C7	10 ⁶ UFC/mL
3	<i>Azotobacter</i> sp. cepa C7	10 ⁵ UFC/mL
4	<i>Azotobacter</i> sp. Cepa nativa de Quinindé	10 ⁶ UFC/mL
5	testigo local, fertilización química	100 g fertilizante/ 20 L agua
6	testigo absoluto, sin fertilización	Ninguno

Para obtener las concentraciones determinadas para cada tratamiento, se realizaron diluciones con agua, en relaciones de dilución de 1 a 10 y 1 a 100, respectivamente.

Las inoculaciones se realizaron cada 28 días, desde el día 1 (primera inoculación), hasta el día 84 (cuarta inoculación). Se suministraron las soluciones en el área radicular, alrededor del tallo, con un chorro constante. Los volúmenes dispuestos en cada inoculación se determinaron con base en el crecimiento general de las plantas y según las recomendaciones de fertilización de los fabricantes de los productos comerciales. Dichas cantidades se muestran en la tabla 2.2.

Tabla 2.2. Volumen de fertilizante o biofertilizante inoculado a cada planta en los días destinados a las labores de fertilización, en mL.

Fertilización	Día de fertilización (desde el inicio del experimento)	Volumen de fertilizante o biofertilizante inoculado por planta (mL/planta)
Primera	1	50
Segunda	28	75
Tercera	56	100
Cuarta	84	125

Para cada inoculación se realizó el cálculo para obtener las concentraciones deseadas, a partir del volumen a inocular en cada día de fertilización. Los cálculos para la obtención de los volúmenes totales y la mezcla a realizar en cada tratamiento constan en el Anexo IV.

Para el tratamiento 5, testigo local con fertilización química, se utilizó el fertilizante foliar Kristalon para inicio (13-40-13 con elementos menores quelatados), en una concentración de 100 g por cada 20 L de agua, con la misma frecuencia y volumen de las inoculaciones a los tratamientos con *Azotobacter* sp.

2.4. ESTUDIO DEL EFECTO DE LAS DOSIS SOBRE LOS PRINCIPALES CARACTERES MORFOLÓGICOS DE LAS PLANTAS

El estudio realizado se enfocó en los principales caracteres morfológicos de las plantas de cacao, que son: altura de la planta, diámetro del cuello del tallo, número de hojas y área foliar. Las mediciones de estas variables se realizaron al final del cuarto mes de estudio, es decir, a los 112 días de la primera inoculación.

1. **Altura de la planta.** Se midió en cm, desde la base de la planta hasta la yema apical, con una cinta métrica rígida.
2. **Diámetro del cuello del tallo.** Se midió en cm, en la base del tallo de la planta, con un calibrador pie de rey, de acero inoxidable.
3. **Número de hojas.** Se contó la totalidad del número de hojas, independientemente de presentar o no algún tipo de anomalía morfológica o fitosanitaria.
4. **Área foliar.** Se calculó a partir de la medición en centímetros del largo y ancho de la primera hoja bajera. Se procuró que las hojas tuvieran la misma edad y que brotaran en el mismo período, consecuentemente, que alcanzaran la madurez en el mismo período de tiempo.

2.5. ESTUDIO DEL ANÁLISIS DE NITRÓGENO FOLIAR REALIZADO A LAS PLANTAS

A los 112 días de la primera inoculación, se trasladaron 3 plantas de cada tratamiento, seleccionadas al azar, a los laboratorios de la Estación Santa Catalina del Instituto Autónomo de Investigaciones Agropecuarias (INIAP), para realizar el análisis de nitrógeno foliar. Debido al número reducido de hojas y el tamaño de cada plántula, se decidió realizar el análisis de nitrógeno con toda la planta.

Para el análisis de nitrógeno total se llevó a cabo el método de Kjeldahl para nitrógeno orgánico, cuyo proceso está descrito por Kirk (1999):

1. **Mineralización de la muestra:** se realizó la combustión de la muestra por calentamiento con ácido sulfúrico concentrado a 400 °C, en presencia de sulfato de cobre como catalizador. El nitrógeno orgánico de la muestra se redujo a amoníaco, en forma de sulfato de amonio.
2. **Destilación de amoníaco:** el sulfato de amonio reaccionó con hidróxido de sodio de concentración 450 g/L. formó hidróxido de amonio, que se destiló por arrastre con vapor para desprender el amoníaco.
3. **Valoración y cálculo de nitrógeno:** el amoníaco se atrapó en ácido clorhídrico 0,1 M, que se tituló con una solución de hidróxido de sodio, a la misma concentración. El cálculo de nitrógeno se realizó mediante la ecuación [2.1]:

$$\%N = \frac{V_a * C_{HCl} * meqN}{M} * 100 \quad [2.1]$$

Donde:

%N: porcentaje de nitrógeno

V_a: gasto (en mL) de ácido clorhídrico para la titulación de la muestra

C_{HCl}: concentración Normal del ácido clorhídrico

meqN: peso miliequivalente de nitrógeno (valor constante de 0,014)

M: peso de la muestra (en g)

Se reportaron los resultados en porcentaje, como se muestra en el Anexo V (g de nitrógeno por cada 100 g de peso seco) y se calculó posteriormente la cantidad de nitrógeno fijada por cada tratamiento en una hectárea de terreno, al multiplicar el porcentaje de nitrógeno total por el peso seco de cada muestra y por el número de plantas que se siembran en una hectárea de suelo destinada para el cultivo de cacao (833 plantas por hectárea).

2.6. DETERMINACIÓN DE LA DOSIS ÓPTIMA DE LA BACTERIA *AZOTOBACTER SP.*

Con ayuda del programa STATGRAPHICS Plus 4.0 para WINDOWS, se determinaron las diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos, con la herramienta de comparación Multifactor ANOVA (Analysis of Variance).

Los procedimientos utilizados para la comparación de los datos fueron el de Promedios Mínimos Cuadrados y el Test de Rangos Múltiples por el método de Diferencia Menos Significativa (DMS), ambos al 95% de confianza.

El tratamiento que arrojó resultados con diferencias significativas en la mayoría de variables, respecto del resto de tratamientos, fue clasificado como la dosis óptima de *Azotobacter sp.* para el cultivo de cacao.

2.7. ANÁLISIS FINANCIERO DE LOS TRATAMIENTOS

Se determinó la variación en los costos de producción entre el uso de la dosis óptima de *Azotobacter sp.* y el uso de fertilizantes químicos, como fuente de nitrógeno, para el crecimiento de las plantas de cacao, con el fin de establecer cuál de los dos tratamientos en mención generó un menor costo por planta y en consecuencia una mayor rentabilidad.

Para este análisis, se determinaron las actividades y los insumos necesarios para la obtención de 100 000 plantas injertadas de cacao genotipo nacional, de 24 semanas de edad, que se comercializan en el vivero de cacao donde se realizó el experimento. Los costos de los insumos y actividades se totalizaron con base en las condiciones del mercado de mano de obra, agroquímicos, semillas e insumos agrícolas del cantón Quinindé, que se mantuvieron constantes durante el desarrollo de la presente investigación. Así mismo, los costos se establecieron a partir de la estructura de costos del vivero donde se realizó la investigación, definida con base en las operaciones y procesos de obtención de plantas injertadas de cacao.

Los insumos y actividades que se seleccionaron para establecer la estructura de costos del vivero fueron:

1. **Patrones de cacao:** plantas destinadas a soportar los injertos de cacao, de 8 semanas de edad. Su costo unitario fue de USD 0,23
2. **Actividades e insumos de injertación:** varetas de cacao genotipo nacional, que tienen las características genéticas para la obtención de un producto de buena calidad, cuyo costo por unidad fue de USD 0,14; fundas de polietileno de USD 0,02 por unidad y mano de obra semi calificada, para la reproducción asexual del cacao genotipo nacional, con un costo por cada planta injertada de USD 0,12.
3. **Actividades e insumos de fertilización:** se establecieron 8 aplicaciones de fertilizante, tanto químico como biológico, con un costo de USD 8,00 por jornal, así como la cantidad de fertilizante suministrada en cada aplicación, que estuvo determinada por la dosis óptima de *Azotobacter* sp. y por la dosis de fertilizante químico utilizada en el presente estudio, con base en las recomendaciones de fertilización de las casas comerciales que fabrican dichos productos.

El costo por litro del producto *Azotobacter* sp. fue de USD 14,00, mientras que el costo por cada litro de fertilizante de composición 13-40-13 fue de USD 7,00. Este rubro fue el único que varió en el estudio, dada la cantidad de fertilizante y biofertilizante utilizada, y el precio por unidad, así, se comparó el costo del fertilizante químico utilizado en el experimento con el biofertilizante *Azotobacter* sp.

4. **Actividades e insumos de labores culturales:** 10 aplicaciones de fungicidas, con un costo de USD 4,50 por litro y USD 8,00 por jornal de aplicación de fungicidas; 125 jornales para control manual de malezas, eliminación de brotes y eliminación de protecciones de los injertos, con un costo de USD 8,00 por jornal.

Posteriormente, se determinó el costo unitario de cada planta injertada y la utilidad bruta de acuerdo a los ingresos con un precio de venta de USD 0,70 por cada planta, el porcentaje de utilidad bruta y la variación de la misma, entre el tratamiento con la dosis óptima de *Azotobacter* sp. y el tratamiento con fertilización química. Para esto, se sumaron todos los rubros establecidos anteriormente sobre la base de una producción de 100 000 plantas injertadas, que es la capacidad de producción del vivero donde se realizó el presente estudio.

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1. PROPAGACIÓN DE *AZOTOBACTER* SP.

Después de la propagación de las dos cepas de *Azotobacter* sp., cepa nativa de la zona donde se realizó el estudio y cepa comercial C7, se determinó la concentración de ambos productos, por medio de un recuento en placa por siembra a profundidad.

Para el caso de la cepa nativa, aislada de suelos del cantón Qunindé, donde se realizó el estudio, se encontró que dicha cepa obtuvo una concentración al final de la propagación de 5×10^{11} UFC/mL; mientras que para el caso de la cepa comercial C7 la concentración final del producto fue 3×10^9 UFC/mL.

La concentración final de la cepa nativa fue significativamente mayor a la cepa comercial, proveniente del banco de cepas del Laboratorio de Microbiología Agrícola de la Pontificia Universidad Católica del Ecuador, lo cual indica que la bacteria aislada de muestras de suelo de la zona de Quinindé tiene una tasa de crecimiento vegetativo mayor a la bacteria de la cepa que se comercializa actualmente como biofertilizante en las condiciones en las que se desarrolló la propagación de las cepas de *Azotobacter* sp.

Las condiciones de mayor crecimiento vegetativo de la cepa nativa no implican una mayor capacidad de fijación de nitrógeno, puesto que esta característica está supeditada a las condiciones genéticas de producción del complejo enzimático nitrogenasa de las cepas de *Azotobacter* y de acuerdo con la disponibilidad de nutrientes en el medio (Dixon y Kahn, 2004).

Los ensayos para determinar las capacidades de fijación de nitrógeno de las cepas estudiadas, así como la viabilidad de utilizarlas como biofertilizantes a nivel financiero se establecieron a partir de las inoculaciones realizadas a las plantas de cacao.

3.2. ALTURA DE PLANTA A LOS 112 DÍAS DESPUÉS DE LA PRIMERA INOCULACIÓN

Se calcularon los promedios de altura de las plantas, en cm, con base en las mediciones realizadas al final del experimento, es decir, a los 112 días después de la primera inoculación. Esta variable es uno de los principales índices morfológicos que se utilizan para medir la eficiencia de diferentes dosis de un producto dado, en este caso, de origen microbiológico, respecto a un tratamiento con fertilización química convencional, y un testigo sin ningún tipo de fertilización (Delgado *et al.*, 2003).

En la tabla 3.1 se indica el promedio de la altura de las plantas de cacao y su error estándar, en cm, a los 112 días de la primera inoculación con *Azotobacter* sp., para cada tratamiento, según el método de mínimos cuadrados al 95% de confianza.

Tabla 3.1. Altura de la planta, en cm, a los 112 días después de iniciado el estudio.

Nivel	Contaje	Promedio (cm)	Error Estándar (cm)	Límite inferior (cm)	Límite superior (cm)
Promedio General	18	33,99			
Tratamientos					
1	3	35,08	0,76	33,38	36,78
2	3	33,44	0,76	31,74	35,14
3	3	35,60	0,76	33,90	37,30
4	3	32,74	0,76	31,04	34,44
5	3	34,59	0,76	32,89	36,29
6	3	32,54	0,76	30,84	34,24

Se encontró que el mayor promedio de altura perteneció al tratamiento 3 (*Azotobacter* sp. cepa C7, concentración 10^5 UFC/mL), con 35,60 cm; mientras que el menor promedio de altura fue registrado en el tratamiento 6 (testigo absoluto, sin fertilización o inoculación), con 32,54 cm. El error estándar determinado para cada promedio, que es una medida de la variabilidad en el muestreo, para este caso fue baja (0,76 cm).

Los intervalos de los promedios de cada tratamiento, al 95% de confianza, que se calcularon con los límites inferior y superior de la tabla 3.1 se pueden observar en la figura 3.1, de acuerdo con el método de diferencia menos significativa (DMS). Existió una diferencia significativa entre los tratamientos 1 y 3 (*Azotobacter* sp. cepa C7, concentración 10^7 UFC/mL, y *Azotobacter* sp. cepa C7, concentración 10^5 UFC/mL respectivamente), respecto a los tratamientos 4 y 6 (*Azotobacter* sp. cepa nativa de Quinindé, 10^6 UFC/mL, y testigo absoluto, sin fertilización o inoculación) para esta variable. Se observa que el tratamiento 5, que correspondió a la fertilización química aplicada, según el método convencional de cultivo, alcanzó una altura semejante a los tratamientos 1 y 3.

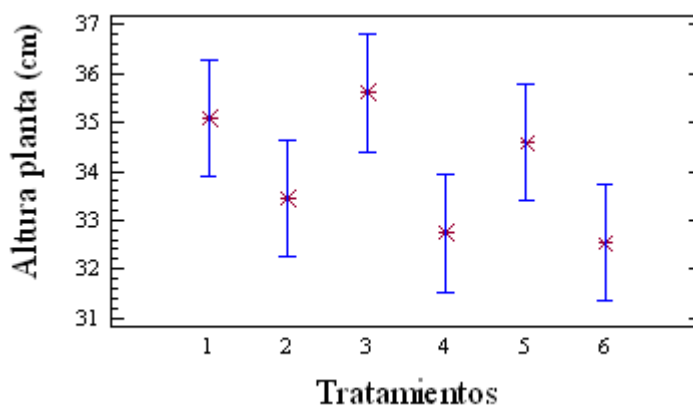


Figura 3.1. Promedios de altura de la planta, con los intervalos al 95% de confianza, en cm, a los 112 días después de iniciado el estudio.

Con la prueba de rangos múltiples mostrada en la tabla 3.2, se determinó el orden de los promedios de crecimiento alcanzados por cada uno de los tratamientos. Se analizó el efecto del uso de *Azotobacter* sp. en el factor altura de la planta, al comparar los diferentes resultados por el método de diferencia menos significativa (DMS) al 95% de confianza. Con dicho método, se establecieron diferentes grupos homogéneos que están representados por columnas de X en la tabla 3.2. De esta manera, se determinó la existencia de diferencias significativas entre los tratamientos que no pertenecen a las mismas columnas de X, de acuerdo con el programa estadístico utilizado (STATGRAPHICS Plus 4.0 para WINDOWS). Las diferencias significativas se establecieron al comparar los rangos de cada

tratamiento. Los tratamientos que presentaron diferencias significativas entre sí están marcados con un asterisco (*).

Tabla 3.2. Rangos múltiples para altura de la planta, en cm, a los 112 días después de iniciado el estudio, por tratamientos.

Método: Diferencia Menos Significativa (DMS) al 95%

Tratamientos	Contaje	Promedio (cm)	Grupos Homogéneos
6	3	32,54	X
4	3	32,74	XX
2	3	33,44	XXX
5	3	34,59	XXX
1	3	35,08	XX
3	3	35,60	X
Interacciones		Diferencia	Límites +/-
1 - 2		1,64	2,41
1 - 3		-0,52	2,41
1 - 4		2,34	2,41
1 - 5		0,49	2,41
1 - 6		*2,54	2,41
2 - 3		-2,16	2,41
2 - 4		0,70	2,41
2 - 5		-1,15	2,41
2 - 6		0,90	2,41
3 - 4		*2,87	2,41
3 - 5		1,01	2,41
3 - 6		*3,06	2,41
4 - 5		-1,85	2,41
4 - 6		0,20	2,41
5 - 6		2,05	2,41

* denota diferencia significativa

Se observa, de esta manera, que existió una diferencia significativa entre el tratamiento 1 (*Azotobacter* sp. cepa C7, concentración 10^7 UFC/mL) respecto al tratamiento 6 (testigo absoluto, sin fertilización o inoculación), y entre el tratamiento 3 (*Azotobacter* sp. cepa C7, concentración 10^5 UFC/mL) respecto a los tratamientos 4 (*Azotobacter* sp. cepa nativa de Quinindé, 10^6 UFC/mL) y el tratamiento 6. Esta diferencia de más de 3 cm del tratamiento con la cepa C7 de la bacteria fijadora de nitrógeno en la concentración más baja (tratamiento 3),

respecto al testigo absoluto, indica un efecto directo del uso del biofertilizante sobre el crecimiento de las plantas injertadas de cacao. Los resultados establecidos para esta variable coinciden con los expuestos por Delgado *et al.* (2003) en el cultivo de café (*Coffea arabica*), en los que los tratamientos con diversas cepas de *Azotobacter* sp. superaron en altura al testigo absoluto.

Los valores arrojados por el tratamiento 5 (fertilización química) indicaron una altura similar a la obtenida por los tratamientos con el biofertilizante; el promedio de altura de este tratamiento ocupó el tercer lugar para esta variable, entre la concentración recomendada por el proveedor de la cepa (tratamiento 2) y la concentración más alta (tratamiento 1), lo que confirma el efecto positivo de la cepa comercial C7 de *Azotobacter* sp. en los cultivos, que aportó nitrógeno a los suelos y contribuyó al crecimiento de las plantas. Resultados semejantes fueron reportados por García *et al.* (2005), que registraron en trigo (*Triticum aestivum* L. var. Pavón) iguales valores de altura en los tratamientos con *Azotobacter* sp. al 50% como urea, que el tratamiento con la fertilización nitrogenada completa.

El bajo nivel de crecimiento en altura de las plantas tratadas con *Azotobacter* sp., aislado de la zona de Quinindé (tratamiento 4), semejante al crecimiento de las plantas del testigo absoluto (tratamiento 6), indica que la cepa mencionada tiene una alta tasa de crecimiento en un medio de cultivo, que se vio reflejada en la concentración inicial del material base para las inoculaciones, pero no favoreció al crecimiento de las plantas inoculadas con dicha cepa.

3.3. DIÁMETRO DE CUELLO DEL TALLO DE PLANTA A LOS 112 DÍAS DESPUÉS DE LA PRIMERA INOCULACIÓN

Se determinaron los promedios de diámetro del cuello del tallo para cada tratamiento, en búsqueda de diferencias que permitan definir la eficacia del uso del biofertilizante en el crecimiento de las plantas injertadas de cacao, en fase de vivero. Los promedios de diámetro de cuello de tallo, en cm, así como la comparación de los tratamientos para esta variable se muestran en la tabla 3.3.

Tabla 3.3. Rangos múltiples para diámetro de tallo, en cm, a los 112 días después de iniciado el estudio, por tratamientos.

Método: Diferencia Menos Significativa (DMS) al 95%

Tratamientos	Contaje	Promedio (cm)	Grupos Homogéneos
4	3	0,96	X
6	3	0,97	X
1	3	1,00	X
5	3	1,01	X
3	3	1,03	X
2	3	1,03	X
Interacciones		Diferencia	Límites +/-
1 - 2		-0,03	0,16
1 - 3		-0,03	0,16
1 - 4		0,04	0,16
1 - 5		-0,005	0,16
1 - 6		0,03	0,16
2 - 3		0,00	0,16
2 - 4		0,08	0,16
2 - 5		0,03	0,16
2 - 6		0,07	0,16
3 - 4		0,08	0,16
3 - 5		0,03	0,16
3 - 6		0,07	0,16
4 - 5		-0,05	0,16
4 - 6		-0,01	0,16
5 - 6		0,04	0,16

En la tabla anteriormente presentada, se observa que los valores obtenidos por todos los tratamientos no se diferencian significativamente entre sí. El diámetro de

las plantas de cacao a la primera inoculación fue de aproximadamente 1 cm. A los 112 días de la primera inoculación no existió variación alguna de ninguna planta en el diámetro del cuello del tallo, con diámetros oscilando entre los 0,9 cm hasta 1,1 cm. La figura 3.2 muestra los intervalos de los promedios del diámetro del cuello del tallo de cada tratamiento, al 95% de confianza.

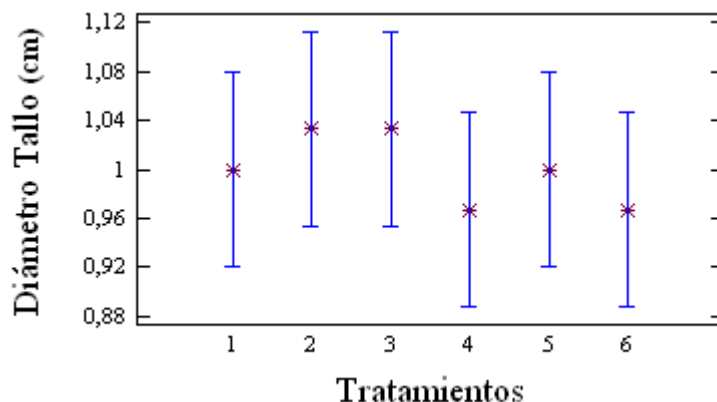


Figura 3.2. Promedios de diámetro de cuello del tallo con los intervalos al 95% de confianza, en cm, a los 112 días después de iniciado el estudio.

La falta de variación del diámetro del cuello del tallo indica que no existió una relación directa entre la fertilización y el aumento de diámetro en la planta de cacao, durante la fase de vivero, a partir de la injertación, y más bien, el incremento del diámetro del cuello del tallo puede estar determinado por el manejo de las plantas desde la siembra de la semilla hasta el momento de la injertación. Esto se comprueba por los resultados obtenidos por Delgado *et al.* (2003) en el cultivo de café, ya que el mencionado estudio se enfocó en las variables morfológicas, desde la siembra de las semillas, hasta la formación de posturas.

3.4. NÚMERO DE HOJAS A LOS 112 DÍAS DESPUÉS DE LA PRIMERA INOCULACIÓN

Se registró el número de hojas por planta, para cada tratamiento. Se identificó la importancia de esta variable morfológica en el presente estudio, puesto que un mayor número de hojas supone una mayor actividad fotosintética y por ende, mayor crecimiento.

Los resultados arrojados por el método de mínimos cuadrados se muestran en la tabla 3.4, que indica el promedio de número de hojas a los 112 días de la primera inoculación con *Azotobacter* sp., para cada uno de los tratamientos.

Tabla 3.4. Número de hojas a los 112 días después de iniciado el estudio.

Nivel	Contaje	Promedio (hojas)	Error Estándar (hojas)	Límite inferior (hojas)	Límite superior (hojas)
Promedio General	18	13,08			
Tratamientos					
1	3	12,95	0,58	11,65	14,25
2	3	12,58	0,58	11,28	13,87
3	3	13,30	0,58	12,00	14,60
4	3	11,63	0,58	10,33	12,93
5	3	13,55	0,58	12,25	14,85
6	3	14,48	0,58	13,18	15,78

El mayor promedio de número de hojas lo obtuvo el tratamiento 6 (testigo absoluto), con 14,48 hojas, mientras que el menor número de hojas lo registró el tratamiento 4 (*Azotobacter* sp. cepa nativa de Quinindé, 10^6 UFC/mL), con un promedio de 11,63 hojas.

Los promedios de número de hojas de cada tratamiento, con sus intervalos respectivos al 95% de confianza, se pueden observar en la figura 3.3.

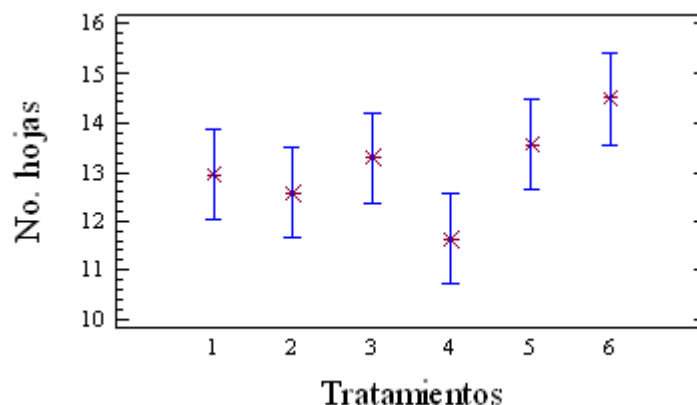


Figura 3.3. Promedios de número de hojas a los 112 días después de iniciado el estudio, con los intervalos al 95% de confianza.

En la figura mencionada se observa que existió una diferencia significativa entre los tratamientos 5 y 6 (fertilización química de acuerdo con método convencional de cultivo, y testigo absoluto respectivamente), con respecto al tratamiento 4 (*Azotobacter* sp. cepa nativa de Quinindé, 10^6 UFC/mL); y entre el tratamiento 6 respecto al tratamiento 2 (*Azotobacter* sp. cepa C7, concentración 10^6 UFC/mL).

Las diferencias significativas entre tratamientos, para esta variable, se muestran en la tabla 3.5, que indica los rangos múltiples para el número de hojas de las plantas, según el método de Diferencia Menos Significativa (DMS), al 95% de confianza.

Las diferencias significativas entre los tratamientos que no pertenecen a las mismas columnas de X, se determinaron a partir de los cálculos obtenidos mediante el programa estadístico STATGRAPHICS Plus 4.0 para WINDOWS.

Las diferencias significativas se establecieron al comparar los rangos de cada tratamiento. Los tratamientos que presentaron diferencias significativas entre sí están marcados con un asterisco (*).

Tabla 3.5. Rangos múltiples para número de hojas a los 112 días después de iniciado el estudio, por tratamientos.

Método: Diferencia Menos Significativa (DMS) al 95%

Tratamientos	Contaje	Promedio (hojas)	Grupos Homogéneos
4	3	11,63	X
2	3	12,58	XX
1	3	12,95	XXX
3	3	13,30	XXX
5	3	13,55	XX
6	3	14,48	X
Interacciones		Diferencia	Límites +/-
1 - 2		0,37	1,84
1 - 3		-0,35	1,84
1 - 4		1,32	1,84
1 - 5		-0,60	1,84
1 - 6		-1,53	1,84
2 - 3		-0,73	1,84
2 - 4		0,95	1,84
2 - 5		-0,98	1,84
2 - 6		*-1,91	1,84
3 - 4		1,67	1,84
3 - 5		-0,25	1,84
3 - 6		-1,18	1,84
4 - 5		*-1,92	1,84
4 - 6		*-2,85	1,84
5 - 6		-0,93	1,84

* denota diferencia significativa

En la tabla 3.5 se observa, que existió una diferencia significativa en la interacción del tratamiento 5 (fertilización química de acuerdo con el método convencional de cultivo) con el tratamiento 4 (*Azotobacter* sp. cepa nativa de Quinindé, 10^6 UFC/mL); y en la relación del tratamiento 6 (testigo absoluto, sin fertilización o inoculación) con los tratamientos 2 y 4 (*Azotobacter* sp. cepa C7, concentración 10^6 UFC/mL, y *Azotobacter* sp. cepa nativa de Quinindé, 10^6 UFC/mL).

Para esta variable, la diferencia entre el testigo absoluto y el tratamiento 2 fue de aproximadamente 2 hojas, la diferencia entre el tratamiento 6 y el tratamiento 4, en cambio, fue de 3 hojas, mientras que entre el tratamiento con fertilización

química (tratamiento 5) y el de la cepa proveniente de Quinindé (tratamiento 4), la diferencia fue de 2 hojas. Esto demostró una leve superioridad del testigo absoluto respecto a los tratamientos con *Azotobacter* sp. en la variable número de hojas, sobre todo con respecto al tratamiento con la bacteria aislada de la propia zona (tratamiento 4).

Por otro lado, se observa que el promedio de número de hojas alcanzado por el tratamiento 5 formó un grupo homogéneo con los tratamientos con la cepa comercial de *Azotobacter* sp., por lo que se infiere que la aplicación del biofertilizante no tuvo un efecto perjudicial en el crecimiento de las plantas de cacao, pero tampoco presentó una acción beneficiosa en esta variable.

Los efectos de *Azotobacter* sobre el número de hojas en el cultivo de cacao difieren en otros cultivos como el café, puesto que Delgado *et al.* (2003) obtuvieron un mayor número de hojas para plántulas de este cultivo respecto a su testigo.

De la misma manera, el testigo absoluto (tratamiento 6) formó un grupo homogéneo con dos de los tres tratamientos con la cepa comercial de *Azotobacter*, que indica que a pesar de existir una diferencia significativa entre el tratamiento 6 y el tratamiento 2 (dosis recomendada por el proveedor de la cepa), el posible efecto del uso del biofertilizante sobre la cantidad de hojas no fue determinante en el crecimiento de las plantas de cacao, hecho que se comprueba al obtener mayor altura de planta en los tratamientos con el biofertilizante respecto al testigo absoluto.

Con estos resultados, se infiere que la aplicación de la bacteria *Azotobacter* sp. no tuvo un efecto sobre la variable número de hojas, hecho que se observa también en la aplicación de otros biofertilizantes a base de microorganismos fijadores de nitrógeno sobre el cultivo de cacao (Aguirre *et al.*, 2007). Sobre esto, se observa que a mayor edad de las plantas, el número de hojas tiende a estabilizarse, de acuerdo con la madurez de las plántulas de cacao de vivero. De esta manera, se entiende que el número de hojas de cada planta obedece más a

un factor genético y agro climático, que a los efectos de absorción de nutrientes o de producción fito-hormonal.

En el estudio realizado por Aguirre *et al.* (2007) sobre el efecto de la biofertilización de plantas de cacao con *A. brasilense* y *G. intraradices*, todos los tratamientos presentaron un promedio de número de hojas similar, inclusive el testigo absoluto, sin ningún tipo de fertilización.

En el mencionado experimento, todos los tratamientos formaron un único grupo homogéneo para esta variable morfológica, en un período de tiempo de 120 días, que se asemeja al del presente estudio.

Esto indica que la adición de nutrientes o de microorganismos benéficos al suelo no tuvo incidencia en el número de hojas de las plántulas de cacao, durante la fase de vivero, y da a suponer que el crecimiento del cacao en términos de número de hojas, durante esta etapa de desarrollo, obedeció a factores distintos al de la acción de los nutrientes sobre las plantas.

Además, la presencia constante de sombra pudo incidir en la formación de hojas de las plantas de cacao de todos los tratamientos, puesto que la luz del sol estimula, en las plantas, la realización de la fotosíntesis, la producción de azúcares y, por ende, la formación de estructuras celulares, tejidos y órganos, entre ellos, las hojas.

3.5. ÁREA FOLIAR A LOS 112 DÍAS DESPUÉS DE LA PRIMERA INOCULACIÓN

Se determinó el área foliar, en cm^2 , de cada tratamiento, a partir de la medición del largo y el ancho, en cm, de la primera hoja bajera. Se estableció la medición de esta hoja, puesto que fue la primera en llegar a un estado de madurez fisiológica, dentro del período de estudio.

La tabla 3.6 muestra los promedios de la variable área foliar y el error estándar, en cm^2 , a los 112 días después de la primera inoculación con *Azotobacter* sp. para cada uno de los tratamientos, calculados por el método de mínimos cuadrados.

Tabla 3.6. Área foliar de las plantas de cacao, en cm^2 , a los 112 días después de iniciado el estudio.

Nivel	Contaje	Promedio (cm^2)	Error Estándar (cm^2)	Límite inferior (cm^2)	Límite superior (cm^2)
Promedio General	18	123,94			
Tratamientos					
1	3	137,16	11,13	112,35	161,96
2	3	117,12	11,13	92,31	141,92
3	3	110,58	11,13	85,78	135,36
4	3	138,09	11,13	113,29	162,90
5	3	127,40	11,13	102,59	152,20
6	3	113,28	11,13	88,48	138,09

El mayor promedio de área foliar lo obtuvo el tratamiento 4 (*Azotobacter* sp. cepa nativa de Quindé, 10^6 UFC/mL), con $138,09 \text{ cm}^2$, mientras que el menor promedio de área foliar lo registró el tratamiento 3 (*Azotobacter* sp. cepa C7, concentración 10^5 UFC/mL), con $110,58 \text{ cm}^2$.

Para esta variable, los tratamientos 1 y 6, con promedios de $137,16 \text{ cm}^2$ y $113,28 \text{ cm}^2$, se encontraron muy cercanos a los resultados arrojados por los tratamientos 4 y 3 respectivamente, con diferencias de $0,9344 \text{ cm}^2$ y $2,7032 \text{ cm}^2$. Sin embargo, la tabla 3.7 indica que en esta variable existió un solo grupo homogéneo, en el

que los tratamientos que alcanzaron los mayores promedios no sobrepasaron los límites calculados para obtener una diferencia significativa.

Tabla 3.7. Rangos múltiples para área foliar de las plantas, en cm^2 , a los 112 días después de iniciado el estudio, por tratamientos.

Método: Diferencia Menos Significativa (DMS) al 95%

Tratamientos	Contaje	Promedio (cm^2)	Grupos Homogéneos
3	3	110,58	X
6	3	113,28	X
2	3	117,12	X
5	3	127,40	X
1	3	137,16	X
4	3	138,09	X
Interacciones		Diferencia	Límites +/-
1 - 2		20,04	35,08
1 - 3		26,58	35,08
1 - 4		-0,93	35,08
1 - 5		9,76	35,08
1 - 6		23,87	35,08
2 - 3		6,54	35,08
2 - 4		-20,98	35,08
2 - 5		-10,28	35,08
2 - 6		3,83	35,08
3 - 4		-27,51	35,08
3 - 5		-16,82	35,08
3 - 6		-2,70	35,08
4 - 5		10,69	35,08
4 - 6		24,81	35,08
5 - 6		14,12	35,08

* denota diferencia significativa

La figura 3.4 muestra que a pesar de no existir diferencias significativas entre los tratamientos, existió un área foliar relativamente mayor en los tratamientos 1 y 4, marcando una tendencia de superioridad en esta variable, mientras que los tratamientos que mostraron el menor índice de área foliar fueron los correspondientes a la menor dosis de *Azotobacter*, y al testigo absoluto (tratamientos 3 y 6). La diferencia entre los tratamientos que alcanzaron los

valores más altos de esta variable y los que obtuvieron los peores resultados oscila entre 23,87 y 27,51 cm².

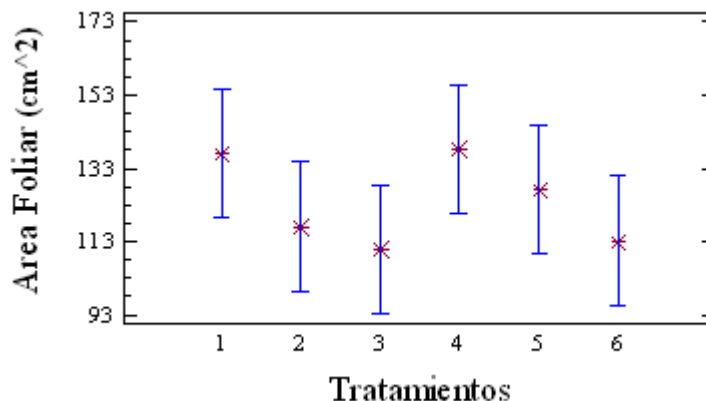


Figura 3.4. Promedios de área foliar de las plantas, con los intervalos al 95% de confianza, en cm², a los 112 días después de iniciado el estudio.

Los resultados arrojados por los diversos tratamientos en el análisis de esta variable, indican una tendencia a obtener mayor área foliar, debido al uso de la mayor dosis de *Azotobacter* sp., que coincide con los resultados obtenidos con la aplicación de otros biofertilizantes sobre plántulas de cacao de vivero (Aguirre *et al.*, 2007), donde no se registraron diferencias significativas para el área foliar entre los tratamientos, pero se observó la tendencia de mayores valores de esta variable con el uso de microorganismos benéficos para la raíz.

Las limitaciones de las plantas a obtener un mayor área foliar pueden deberse más bien a factores genéticos y agro climáticos, puesto que el uso de *Azotobacter* en el cultivo de café generó mayores valores de área foliar respecto al testigo (Delgado *et al.*, 2003).

Los resultados obtenidos de número de hojas y área foliar indican una limitada acción de las cepas de *Azotobacter* sobre el crecimiento de las hojas, tanto en número como en área, de las plantas de cacao genotipo nacional, respecto a los tratamientos con fertilización química y el testigo absoluto.

Aguirre *et al.* (2007) registraron, para la variable morfológica área foliar de las plántulas de cacao, un único grupo homogéneo entre todos los tratamientos, con una superioridad relativa de la inoculación con *A. brasilense*, seguida por los tratamientos con mezclas de *A. brasilense* y *G. intraradices* y el tratamiento con *G. intraradices* solamente, mientras que el testigo, sin ningún tipo de inoculación, obtuvo los menores valores dentro del grupo homogéneo.

Los resultados obtenidos por el presente estudio, tanto en el número de hojas como en el área foliar, indican que la inoculación de bacterias fijadoras de nitrógeno al suelo no generó una respuesta positiva por parte de las plantas en cuanto al desarrollo de las hojas de las plántulas de cacao, durante la fase de vivero, lo que supone que la formación de las hojas en este cultivo está determinado por factores distintos al de la acción del nitrógeno fijado en el suelo por *Azotobacter* sp., en las plantas de cacao.

3.6. NITRÓGENO TOTAL A LOS 112 DÍAS DESPUÉS DE LA PRIMERA INOCULACIÓN

Con base en los resultados obtenidos del análisis de nitrógeno total realizado a las plantas de cacao de cada tratamiento según el método de Kjeldahl (Kirk, 1999), se calculó la cantidad de nitrógeno fijada por cada tratamiento en una hectárea de terreno. Se multiplicó el porcentaje de nitrógeno total de cada planta por el peso seco de cada muestra, posteriormente se multiplicó cada valor por el número de plantas que se siembran en una hectárea de suelo destinada para el cultivo de cacao (833 plantas por hectárea).

La tabla 3.8 indica el promedio de nitrógeno total fijado por cada uno de los tratamientos (en gramos de N/hectárea), a los 112 días de la primera inoculación con *Azotobacter* sp., y el error estándar, calculados con el programa STATGRAPHICS Plus 4.0 para WINDOWS, por el método de mínimos cuadrados al 95% de confianza.

Tabla 3.8. Nitrógeno total fijado, en g N/ha, a los 112 días después de iniciado el estudio.

Nivel	Contaje	Promedio (g N/ha)	Error Standard (g N/ha)	Límite inferior (g N/ha)	Límite superior (g N/ha)
Promedio General	18	85,83			
Tratamientos					
1	3	101,56	7,89	83,98	119,14
2	3	98,59	7,89	81,01	116,17
3	3	74,57	7,89	56,99	92,15
4	3	89,21	7,89	71,63	106,79
5	3	87,23	7,89	69,65	104,81
6	3	63,80	7,89	46,22	81,38

El mayor valor de esta variable lo obtuvo el tratamiento 1 (*Azotobacter* sp. con la mayor concentración), con 101,56 g N/ha. El tratamiento 6 (testigo absoluto) registró la menor cantidad de nitrógeno por hectárea, con un valor de 63,80 g N/ha. El tratamiento 2 (*Azotobacter* sp. cepa C7, concentración 10^6 UFC/mL) obtuvo el segundo valor más alto para esta variable, con 98,59 g N/ha, siendo muy semejante al del tratamiento 1. El error estándar para esta variable fue de

7,89 g N/ha. El orden de los promedios de nitrógeno total alcanzados por cada uno de los tratamientos y las diferencias significativas entre estos se muestra en la tabla 3.9.

Tabla 3.9. Rangos múltiples para nitrógeno total fijado, en g N/ha, a los 112 días después de iniciado el estudio, por tratamientos.
Método: Diferencia Menos Significativa (DMS) al 95%

Tratamientos	Contaje	Promedio (g N/ha)	Grupos Homogéneos
6	3	63,80	X
3	3	74,57	XX
5	3	87,23	XXX
4	3	89,21	XX
2	3	98,59	XX
1	3	101,56	X
Interacciones		Diferencia	Límites +/-
1 - 2		2,96	24,86
1 - 3		*26,99	24,86
1 - 4		12,35	24,86
1 - 5		14,33	24,86
1 - 6		*37,76	24,86
2 - 3		24,02	24,86
2 - 4		9,39	24,86
2 - 5		11,37	24,86
2 - 6		*34,80	24,86
3 - 4		-14,64	24,86
3 - 5		-12,66	24,86
3 - 6		10,77	24,86
4 - 5		1,98	24,86
4 - 6		*25,41	24,86
5 - 6		23,43	24,86

* denota significancia estadística

Se observa que existió una diferencia significativa en la relación del tratamiento 1 con los tratamientos 3 y 6; en la relación del tratamiento 2 con el tratamiento 6; y en la relación del tratamiento 4 con el tratamiento 6. Los tratamientos 1, 2 y 4, con diferentes dosis de *Azotobacter* sp., que obtuvieron los mayores valores de nitrógeno total por planta, formaron junto con el tratamiento 5 (fertilización química) un solo grupo homogéneo, que indica la eficacia del uso de *Azotobacter*

sp. como biofertilizante, desde la dosis recomendada por el proveedor de la cepa, obteniendo resultados similares a los obtenidos por la fertilización química, e incluso llegando a superarlos, con diferencias a partir de 11,37 g N/ha.

Los intervalos de los promedios de esta variable para cada tratamiento, al 95% de confianza se observan en la figura 3.5.

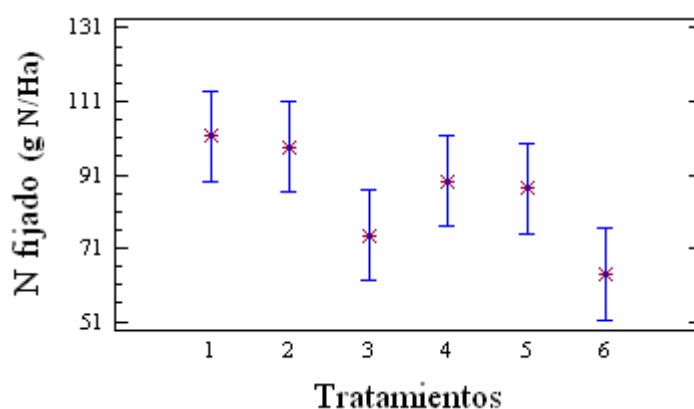


Figura 3.5. Promedios de nitrógeno total fijado, con los intervalos al 95% de confianza, en g N/ha, a los 112 días después de iniciado el estudio.

En la figura mencionada se evidencia que existió superioridad en la cantidad de nitrógeno fijada por los tratamientos 1, 2, 4 y 5 (*Azotobacter* sp. cepa C7, concentración 10^7 UFC/mL, *Azotobacter* sp. cepa C7, concentración 10^6 UFC/mL, *Azotobacter* sp. Cepa nativa de Quinindé, concentración 10^6 UFC/mL, fertilización química, concentración 100 g fertilizante/ 20 L agua, respectivamente), frente a los tratamientos 3 y 6 (*Azotobacter* sp. cepa C7, concentración 10^5 UFC/mL y testigo absoluto, sin fertilización, respectivamente).

De los tratamientos con mayor fijación de nitrógeno, se observa que la cepa comercial C7 (tratamientos 1 y 2) obtuvo una superioridad relativa frente a las plantas tratadas con la cepa nativa de Quinindé y con fertilización química (tratamientos 4 y 5) en términos de fijación de nitrógeno por hectárea. Se evidencia de esta manera que la fijación de nitrógeno por el biofertilizante fue

similar al de la fertilización química, a partir de la concentración recomendada por el proveedor.

También se observa que la cantidad de nitrógeno fijada por el tratamiento con la menor concentración de *Azotobacter* (tratamiento 3), fue intermedia entre el testigo absoluto y el tratamiento con fertilización química, lo que demuestra que, con la concentración más baja del biofertilizante la capacidad de fijar nitrógeno no fue suficiente como para igualar la cantidad de nitrógeno que se añadió a las plantas a través de la fertilización química para este cultivo. El tratamiento 4, con la cepa nativa de *Azotobacter*, fijó una cantidad de nitrógeno muy similar a la fertilización química, lo cual confirma su eficiencia en la fijación de nitrógeno.

Las cantidades de nitrógeno fijadas por los tratamientos con *Azotobacter* sp. coinciden con el promedio de fijación de nitrógeno de esta bacteria, en condiciones ecológicas normales (Stanier *et al.*, 1996). Se ha determinado que la mayoría de especies de *Azotobacter* fijan alrededor de 0,26 kg N/ha-año; si se multiplican los promedios de fijación de nitrógeno de los tratamientos con *Azotobacter* sp. del presente estudio (que fue de cuatro meses) por 3, fijarían entre 0,22 y 0,30 kg N/ha-año.

Se observa que dichas cantidades de nitrógeno fijadas por el biofertilizante fueron suficientes para satisfacer los requerimientos de este elemento para el cultivo de cacao, durante la etapa de vivero a partir de la injertación de las plantas, con una presencia constante de sombra, puesto que para el tratamiento de fertilización química se siguieron las recomendaciones de fertilización para el crecimiento de las plantas de vivero (Ministerio de Agricultura de Perú, 2004; Rodríguez, 2001).

3.7. DETERMINACIÓN DE LA DOSIS ÓPTIMA DE LA BACTERIA *AZOTOBACTER* SP.

El resumen de los resultados obtenidos por los tratamientos en las variables analizadas en el presente estudio, a los 112 días de la primera inoculación se muestra en la tabla 3.10:

Tabla 3.10. Resumen de resultados obtenidos por cada tratamiento, en cada variable, a los 112 días de iniciado el estudio.

Tratamiento	Altura de planta (cm)		Diámetro de cuello de tallo (cm)		Número de hojas		Área foliar (cm ²)		Nitrógeno fijado (g N/ha)	
T1: <i>Azotobacter</i> sp. cepa C7, conc. 10 ⁷ UFC/mL	35,08	XX	1,00	X	12,95	XXX	137,16	X	101,56	X
T2: <i>Azotobacter</i> sp. cepa C7, conc. 10 ⁶ UFC/mL	33,44	XXX	1,03	X	12,58	XX	117,12	X	98,59	XX
T3: <i>Azotobacter</i> sp. cepa C7, conc. 10 ⁵ UFC/mL	35,60	X	1,03	X	13,30	XXX	110,58	X	74,57	XX
T4: <i>Azotobacter</i> sp. Cepa nativa de Quinindé, conc. 10 ⁶ UFC/mL	32,74	XX	0,96	X	11,63	X	138,09	X	89,21	XX
T5: Fertilización química, conc. 100 g fert. / 20L agua	34,59	XXX	1,01	X	13,55	XX	127,40	X	87,23	XXX
T6: Testigo absoluto, sin fertilización	32,54	X	0,97	X	14,48	X	113,28	X	63,80	X

Los resultados obtenidos en el estudio realizado indican que las inoculaciones con *Azotobacter* sp., incluso en la concentración más baja, tuvieron un efecto positivo en el desarrollo de la altura de las plantas de cacao, al obtener los mismos niveles de la fertilización química e, incluso, con una tendencia a superarlos. En este caso, se debe notar que además de la aplicación del biofertilizante, no existió otro tipo de fertilización química u orgánica en los tratamientos con *Azotobacter* sp.,

por lo que se infiere un efecto de mejora de la absorción de los nutrientes en el suelo por el beneficio de la asimilación de nitrógeno (INPOFOS, 1999).

En el caso de las variables número de hojas y área foliar, la inoculación de las plántulas de cacao con *Azotobacter* sp. no tuvo un efecto significativo respecto a la fertilización química y al testigo absoluto, hecho que, para el caso del cacao, puede deberse a factores genéticos de las plantas de cacao o a las características agro climáticas de la zona donde se realizó el estudio.

Por otra parte, se observa que el efecto de la inoculación con *Azotobacter* sp. en la cantidad de nitrógeno fijado fue notable a partir de la dosis recomendada por el proveedor de la cepa comercial (tratamiento 2), lo que concuerda con la capacidad de fijación de nitrógeno de la bacteria.

La cantidad de nitrógeno fijado por el tratamiento 1, con la concentración más alta de la cepa comercial de *Azotobacter* sp., fijó una cantidad mayor de nitrógeno al suelo, pero no lo suficientemente alta para justificar su uso en condiciones competitivas en el mercado de productos para la nutrición vegetal, dado que dicha concentración fue 10 veces mayor a la concentración recomendada por el proveedor de la cepa comercial, lo cual implica un gasto mayor en términos económicos.

Para el caso del tratamiento 4, correspondiente a las plantas inoculadas con la bacteria aislada del sector donde se realizó el experimento (Quinindé-Esmeraldas), se observa que, en las condiciones del experimento, dicha cepa no produjo un aumento sustancial del crecimiento respecto a las plantas de los tratamientos con la cepa comercial.

En cuanto a la capacidad de fijación de nitrógeno, se demostró que la cepa proveniente de suelos de la zona fijó este elemento en el mismo rango de la cepa comercial, por lo que se deben realizar mayores estudios para analizar el potencial comercial de la bacteria extraída en estas condiciones.

Con todas las variables analizadas y al dar un mayor énfasis a la característica de fijación de nitrógeno de *Azotobacter*, se deduce que la dosis óptima para la fertilización de plantas de cacao de vivero es la del tratamiento 2, correspondiente a la recomendación del proveedor de la cepa comercial, con concentración 10^6 UFC/mL. La cantidad de este producto a ser inoculada por planta debe estar en función del crecimiento radicular de la planta y del mantenimiento de la población microbiana en el suelo, con volúmenes similares a la cantidad de fertilizante nitrogenado que usualmente se utiliza. El efecto de esta bacteria puede ser mejor con la adición constante de materia orgánica y de prácticas culturales que favorezcan el crecimiento microbiano.

3.8. ANÁLISIS FINANCIERO DEL USO DE LA DOSIS ÓPTIMA

Se determinaron los costos de producción del uso de la cepa *Azotobacter* sp., concentración 10^6 UFC/mL, como única fuente de fertilización desde la injertación hasta el trasplante y, se comparó con los costos de producción actuales del vivero de cacao, en donde se utiliza un fertilizante foliar de composición 13-40-13 (13% nitrógeno, 40% fósforo, 13% potasio) más elementos menores quelatados, en la misma etapa de crecimiento de las plantas de cacao.

El análisis financiero del uso de *Azotobacter* sp., concentración 10^6 UFC/mL, como único fertilizante en la producción de plantas injertadas de cacao en un vivero de la provincia de Esmeraldas, se muestra en la tabla 3.11.

Tabla 3.11. Análisis financiero para vivero de cacao (100 000 plantas), desde injertación hasta trasplante, usando *Azotobacter* sp. como fuente de fertilización.

Actividades e Insumos	Unidad de Medida	Cantidad	Valor Unitario	Valor Total
Patrones de 8 semanas de edad	Unidad	100 000,00	0,23	23 000,00
1. Injertación				
Varetas	Unidad	100 000,00	0,14	14 000,00
Fundas de polietileno	Unidad	100 000,00	0,02	2 000,00
Mano se obra semi calificada	Injertación	100 000,00	0,12	12 000,00
2. Fertilización				
Biofertilizante (<i>Azotobacter</i>)	L.	44,00	14,00	616,00
Aplicaciones (<i>Azotobacter</i>)	Jornal	8,00	8,00	64,00
3. Labores culturales				
Fungicida	kg.	40,00	4,50	180,00
Aplicaciones Fungicida	Jornal	10,00	8,00	80,00
Eliminación protección injerto	Jornal	125,00	8,00	1 000,00
Eliminación de brotes	Jornal	125,00	8,00	1 000,00
Control de malezas	Jornal	125,00	8,00	1 000,00
TOTAL				54 940,00
COSTO UNITARIO				0,55
PRECIO DE VENTA				0,70
INGRESOS POR VENTA DE PLANTAS				70 000,00
UTILIDAD BRUTA			% (21,5%)	15 060,00

En ambos tratamientos, fertilización con *Azotobacter* sp., concentración 10^6 UFC/mL, y fertilización química convencional con el uso de un fertilizante foliar de composición 13-40-13, se mantuvieron constantes los costos de los insumos y

actividades de patrones, injertación y labores culturales adicionales. Solamente variaron los costos generados por las actividades e insumos de fertilización. Además, se determinó el valor de los ingresos por la venta de las plantas injertadas de cacao para los dos casos, con un precio de venta de USD 0,70 por planta y se encontró la utilidad bruta de los tratamientos, y su porcentaje.

Se compararon los costos unitarios de cada tratamiento y se estableció el impacto del uso del biofertilizante en el vivero de cacao, a nivel financiero. Los costos de producción con fertilización química (fertilizante foliar de composición 13-40-13) constan en la tabla 3.12.

Tabla 3.12. Análisis financiero para vivero de cacao (100 000 plantas), desde injertación hasta trasplante, usando fertilizante foliar de composición 13-40-13 (13% nitrógeno, 40% fósforo, 13% potasio) más elementos menores quelatados como fuente de fertilización.

Actividades e Insumos	Unidad de Medida	Cantidad	Valor Unitario	Valor Total
Patrones de 8 semanas de edad	Unidad	100 000,00	0,23	23 000,00
1. Injertación				
Varetas	Unidad	100 000,00	0,14	14 000,00
Fundas de polietileno	Unidad	100 000,00	0,02	2 000,00
Mano se obra semi calificada	Injertación	100 000,00	0,12	12 000,00
2. Fertilización				
Fertilizante (13-40-13)	kg	32,00	7,00	224,00
Aplicaciones (13-40-13)	Jornal	8,00	8,00	64,00
3. Labores culturales				
Fungicida	kg.	40,00	4,50	180,00
Aplicaciones Fungicida	Jornal	10,00	8,00	80,00
Eliminación protección injerto	Jornal	125,00	8,00	1 000,00
Eliminación de brotes	Jornal	125,00	8,00	1 000,00
Control de malezas	Jornal	125,00	8,00	1 000,00
TOTAL				54 548,00
COSTO UNITARIO				0,55
PRECIO DE VENTA				0,70
INGRESOS POR VENTA DE PLANTAS				70 000,00
UTILIDAD BRUTA			% (22,1%)	15 452,00

El costo del uso de *Azotobacter* sp. como fuente de fertilización en el vivero es mayor al costo del uso de un fertilizante foliar de composición 13-40-13, en USD 392,00. Este valor no incide determinantemente sobre el costo de cada planta, que es de USD 0,55.

La diferencia del costo de la fertilización química y la biofertilización representa una diferencia de 0,6% en la utilidad bruta de cada tratamiento, lo cual no es un monto significativo en el proceso económico. Esto demuestra la viabilidad financiera de utilizar *Azotobacter* como fertilizante, ya que en el presente estudio se obtuvo una utilidad semejante al uso de fertilizantes químicos en el proceso de producción de plantas injertadas de cacao, desde la injertación hasta la venta y trasplante al sitio definitivo. Además, el beneficio del uso de biofertilizantes genera un valor adicional en cada planta de cacao, desde el punto de vista ambiental.

4. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

4.1. CONCLUSIONES

1. La inoculación con la cepa comercial C7 de *Azotobacter* sp., en plantas injertadas de cacao (*Theobroma cacao*), tuvo un efecto positivo en el desarrollo de la altura de las plantas, que fue semejante al crecimiento obtenido por las mismas con la fertilización química. El efecto de esta bacteria sobre esta variable morfológica se evidenció incluso con la concentración más baja utilizada (10^5 UFC/mL).
2. El uso de *Azotobacter* sp. como biofertilizante no tuvo efecto alguno sobre el diámetro del tallo ni el crecimiento de las hojas, tanto en número como en el área foliar de las plantas injertadas de cacao genotipo nacional.
3. El contenido de nitrógeno total fijado al suelo fue significativamente mayor en plantas inoculadas con *Azotobacter* sp., a partir de la concentración 10^6 UFC/mL, respecto al testigo absoluto. El uso de esta bacteria llegó al mismo nivel de la fertilización química, en cuanto a la cantidad de nitrógeno introducida al suelo.
4. Se determinó que la dosis óptima para la fertilización de plantas injertadas de cacao genotipo nacional con *Azotobacter* sp. fue la de concentración 10^6 UFC/mL, correspondiente a la recomendación del proveedor de la cepa comercial.
5. Con el uso de *Azotobacter* sp., concentración 10^6 UFC/mL, se obtuvo un costo unitario similar al de la fertilización química, con un beneficio ecológico de disminución del consumo de agroquímicos, lo cual determina la factibilidad de reemplazar las prácticas agrícolas convencionales en la etapa de crecimiento que fue el objeto de estudio.

4.2. RECOMENDACIONES

1. Desarrollar estudios sobre el efecto de la inoculación con *Azotobacter* sp. en otras etapas del crecimiento de las plantas de cacao, como la germinación de las semillas, desde el trasplante y en la etapa de producción. El presente estudio se enfocó solamente desde la injertación hasta el momento del trasplante, debido a las necesidades del vivero donde se realizó el estudio y a que esta fue la primera experiencia con el uso de la bacteria en mención en la especie *Theobroma cacao*.
2. Aislar cepas nativas de bacterias fijadoras de nitrógeno de diversos lugares, para comprobar la capacidad de fijación de las mismas, y posteriormente sacar al mercado productos comerciales adecuados para cada rango de temperatura y altitud. Las cepas utilizadas son provenientes de suelos de la serranía ecuatoriana y de la localidad donde se realizó el estudio, por lo que se deberán realizar investigaciones posteriores de aislamiento de bacterias del resto del país.
3. Analizar el efecto de *Azotobacter* sp. en las variables morfológicas y fisiológicas de otros cultivos importantes para la economía del país, que tienen potencial en el mercado de los productos orgánicos.

BIBLIOGRAFÍA

1. Agronet Software Pvt. Ltd. 2004. "*Azotobacter*". http://www.indiaagronet.com/indiaagronet/Manuers_fertilizers/azotobacter.htm (Julio 2009)
2. Aguirre, J.; Mendoza, A.; Cadena, M. 2007. "Efecto de la biofertilización en vivero del cacao (*Theobroma cacao* L) con *Azospirillum brasilense* Tarrand, Krieg et döbereiner y *Glomus intraradices* Schenk et Smith". INCI, ago. 2007, vol.32, no.8, p.541-546.
3. ANECACAO. 2009. "Origen del cacao en el Ecuador". <http://www.anecacao.com/spanish/HistoriaCacao.aspx> (Mayo 2009)
4. Ardila, N. 2006. "Fijación de Nitrógeno atmosférico". http://www.agricultura sensitiva.com/n_atmosferico.htm (Julio 2009)
5. Bernal, J.; Torres, M.; Valencia, S.; Martínez, P. 2000. "Isolation of Enterobacteria, *Azotobacter* sp. and *Pseudomonas* sp., producers of Indole-3-Acetic acid and Siderophores, from Colombian Rice Rhizosphere". *Revista Latinoamericana de Microbiología*. 42: 171-176
6. Brantley, S. 2008. "*Azotobacter vinelandii*". <http://www.essc.psu.edu/~brantley/metha.html> (Junio 2009)
7. CCBOL GROUP SRL. 2008. "Biofertilizantes" <http://ccbolgroup.com/vermi.html> (Marzo 2009)
8. Coyne, M. 2000. "Microbiología del Suelo: Un Enfoque Exploratorio". Editorial Paraninfo, España, pp 255-258

9. Delgado, Y.; Cupull, R.; Pérez, C.; Sánchez, A.; Vilchez, M. 2003. "Efecto de *Azotobacter* spp. en la estimulación de la germinación y el desarrollo de posturas de *Coffea arabica* L". Centro Agrícola. Año 30. No. 1. p 26-31
10. Dixon, R.; Kahn, D. 2004. "Genetic Regulation of Biological Nitrogen Fixation". NATURE REVIEWS - MICROBIOLOGY. Volumen 2. p 61
11. ECOVAD. 2008. "*Azotobacter* extracto 100% SL Nitrosei". http://www.terraia.com/productos_e_insumos_para_agricultura_ecologica/index.php?proceso=registro&numero=200 (Enero 2009)
12. Editorial Continental. 1982. "Cacao". Ed. Continental. México, pp 150-159
13. Enríquez, G. 2004. "CACAO ORGÁNICO - Guía para productores ecuatorianos". INIAP, Manual Nro. 54. Ecuador, pp 5-76
14. Espín, G. 2002. "Biología de *Azotobacter vinelandii*". http://www.microbiologia.org.mx/microbiosenlinea/CAPITULO_09/Capitulo09.pdf. (Julio 2009)
15. Flores, D. 2008. "Cacao: Producto de exportación". <http://www.articulo.org/idx/27/3629/Ciencias/article/Cacao-Producto-de-exportacin.html> (Febrero 2009)
16. Garassini, L. 1967. "Microbiología Agraria". Parte II. Universidad Central de Venezuela, Facultad de Agronomía, pp 415, 416, 417
17. García, M. 2003. "Bacterias fijadoras de nitrógeno de vida libre". http://jaibana.udea.edu.co/grupos/microbiol/fijadoras_de_nitrogeno.ppt. (Mayo 2009)

18. García, M.; Farías, R.; Peña, J.; Sánchez, J. 2005. "Respuesta del Trigo var. Pavón a la Inoculación con *Azospirillum* y *Azotobacter*". Terra Latinoamericana. Volumen 23. Número 1. pp 65-72
19. González, C.; Carballo, O.; Acanda, S.; Carballo, N.; Remigio, A.; Pérez, G.; Fernández, N.; Hernández, Y.; Mancebo, A.; Bada, A. 2001. "Evaluación del Dimargon durante un ensayo Ecotoxicológico". Revista de Toxicología. año/vol 18. número 003. España. p 157
20. Gregory, R. 2009. "Cacao beans: Criollo, Forastero and Trinitario". <http://rawketscience.blogspot.com/2009/04/cacao-beans-criollo-forastero-and.html> (Junio 2009)
21. Haaker, H. 1988. "Biochemistry and Physiology of Nitrogen Fixation". BioEssays Vol. 9, No. 4 - October 1988. p 112-113
22. Hernández, M.; Chailloux, M. 2001. "La nutrición mineral y la biofertilización en el cultivo del tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill)". Temas de Ciencia y Tecnología. Vol. 5. Número 13. Enero-abril 2001. pp 11-27
23. INIAP 2006. "Cacao Nacional Fino de Aroma". http://www.iniap-ecuador.gov.ec/noticia.php?id_noticia=131 (Junio 2009)
24. INPOFOS. 1999. "Manual Internacional de la Fertilidad del Suelo". INPOFOS, Quito, Ecuador, pp 3.1-4.2
25. International Cocoa Organization. 2008. "Revision of annex "C" of the International Cocoa Agreement". <http://www.icco.org/pdf/RevisedAnnexC.pdf> (Mayo 2009)
26. International Cocoa Organization. 2009 (a). "Growing cocoa". <http://www.icco.org/about/growing.aspx> (Mayo 2009)

27. International Cocoa Organization. 2009 (b). "ICCO Monthly Averages of Daily Prices". <http://www.icco.org/statistics/monthly.aspx> (Octubre 2008)
28. Jiménez, D. 2007. "Caracterización molecular de cepas nativas colombianas de *Azotobacter* spp. mediante el análisis de restricción del ADN ribosomal 16S". Trabajo de Grado previo a la obtención del título de Microbiólogo Industrial, Pontificia Universidad Javeriana, Bogotá, Colombia, p 86
29. Joint Genome Institute. 2009. "Taxon Details". http://img.jgi.doe.gov/cgi-bin/pub/main.cgi?section=TaxonDetail&page=taxonDetail&taxon_oid=638341010 (Junio 2009)
30. Kirk, R. 1999. "Composición y Análisis de los Alimentos de Pearson". Compañía Editorial Continental SA, Novena Edición, México, pp 19-21
31. Lemin, C. 2005. "Growing cocoa". <http://www2.dpi.qld.gov.au/horticulture/6222.html> (Junio 2009)
32. Mayea, S.; Carone, M.; Novo, R.; Boado, I.; Silveira, E.; Soria, M.; Morales, Y.; Valiño, A. 1998. "Microbiología Agropecuaria". Tomo II, Ed. Félix Varela, La Habana, Cuba, pp 158-159
33. Ministerio de Agricultura de Perú. 2004. "Manual del Cultivo del Cacao". Ministerio de Agricultura de Perú, Programa para el desarrollo de la Amazonía PROAMAZONIA. Perú, pp 8-24
34. Ministerio de Agricultura y Ganadería del Ecuador. 2001. "Identificación de Mercados y Tecnología para Productos Agrícolas Tradicionales de Exportación". Convenio MAG/IICA, Subprograma de Cooperación Técnica. Ecuador, pp 3-7, 21-28

35. Ministerio de Agricultura, Ganadería, Acuacultura y Pesca del Ecuador. 2006. "Cultivo orgánico de Cacao" <http://www.magap.gov.ec/magapweb/BIBLIOTECA/AGRICOLA/CULTIVOS%20ORGANICOS/cacao.pdf> (Diciembre 2008)
36. Oelze, J. 2000. "Respiratory protection of nitrogenase in *Azotobacter* species: is a widely held hypothesis unequivocally supported by experimental evidence?". *FEMS Microbiology Reviews* No. 24 pp 321-333
37. Olivares, J. 2008. "Bosquejo histórico de la FBN". <http://www.eez.csic.es/~olivares/ciencia/fijacion/bosquejo.html> (Julio 2009)
38. Organización de Las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación FAO. 2004. "Perspectivas a Plazo Medio de los Productos Básicos Agrícolas: PROYECCIONES AL AÑO 2010". <http://www.fao.org/docrep/007/y5143s/y5143s0w.htm#bm32> (Octubre 2008)
39. Pankratz, S. 1995. "*Azotobacter* Cysts". <http://microbezoo.commtechlab.msu.edu/zoo/zdrs0309.jpg> (Junio 2009)
40. Rodríguez, N. 2001. "Manejo integral del cultivo del cacao. Establecimiento de plantas en campo, viveros y propagación, rehabilitación y recuperación de plantaciones de cacao". http://www.cacao.fundacite.org.gov.ve/aragua/manual_establ_viveros.pdf (Julio 2009)
41. Rodríguez, N. 2006. "Botánica del cacao. Etapa I". <http://ftpctic.agr.ucv.ve/intranet/agronomia/cultrop2/botanica.pdf> (Abril 2009)
42. Setubal, J. 2009. "*Azotobacter vinelandii* genome Project". <http://www.azotobacter.org/project.html> (Junio 2009)
43. Stanier, R.; Ingraham, J.; Wheelis, M.; Painter, P. 1996. "Microbiología". Segunda edición. Reverte S.A. p 590

44. Sutherland, J. 2009. "Cocoa Project" http://www.uq.edu.au/_School_Science_Lessons/CocoaProj.html (Abril 2009)
45. Sylvia, D.; Fuhrmann, J.; Hartel, P.; Zuberer, D. 2005. "Principles and Applications of Soil Microbiology". Segunda Edición, Editorial Pearson Prentice Hall, USA, pp 373-389
46. Uniprot Consortium. 2009. "*Azotobacter vinelandii* DJ". <http://www.uniprot.org/taxonomy/322710> (Junio 2009)
47. Universal Taxonomic Services. 2008. "Taxon: *Theobroma cacao* Linnaeus - cocoa". <http://taxonomicon.taxonomy.nl/TaxonTree.aspx?id=6284> (Abril 2009)
48. Urquhart, D. 1963. "Cacao". Instituto Interamericano de Ciencias Agrícolas de la OEA. Costa Rica, pp 51-61
49. Weaver, R.; Angle, J.; Bottomley, P. 1994. "Methods of soil analysis. Part 2. Microbiological and Biochemical properties". Soil Science Society of America Book Series; no. 5. USA, pp 179-185

ANEXO I.
UBICACIÓN DEL VIVERO
CANTÓN QUININDÉ – PROVINCIA DE ESMERALDAS

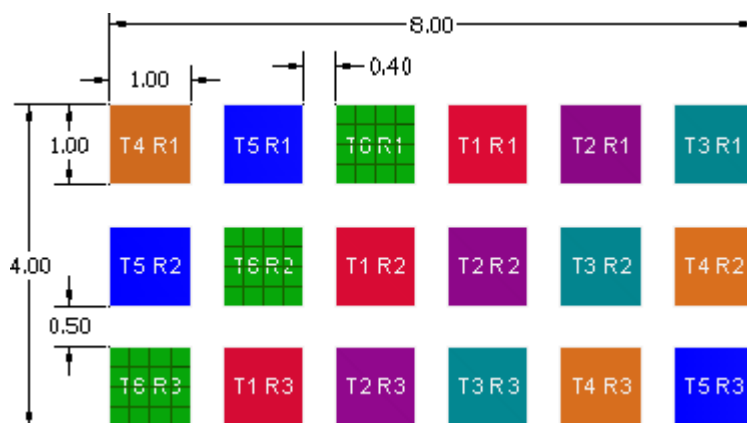


ANEXO II.
COMPOSICIÓN DEL MEDIO DE CULTIVO ASHBY

COMPOSICIÓN	CONCENTRACIÓN (g/l)
Sacarosa/Manitol o Benzoato	5,0
KH ₂ PO ₄	1,0
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,2
FeSO ₄ .7H ₂ O	0,005
NaCl	0,2
CaCl ₂ .2H ₂ O	0,2
Agar	15,0

pH 7,0 (+/- 0,2) (Jiménez, 2007)

ANEXO III.
DISTRIBUCIÓN DE BLOQUES (TRATAMIENTOS Y REPETICIONES) EN EL LUGAR DE ESTUDIO



Código	Tipo de Fertilización o Inoculación	Concentración
T1R1, T1R2, T1R3	<i>Azotobacter</i> sp. cepa C7	10^7 UFC/mL
T2R1, T2R2, T2R3	<i>Azotobacter</i> sp. cepa C7	10^6 UFC/mL
T3R1, T3R2, T3R3	<i>Azotobacter</i> sp. cepa C7	10^5 UFC/mL
T4R1, T4R2, T4R3	<i>Azotobacter</i> sp. cepa nativa de Quinindé	10^6 UFC/mL
T5R1, T5R2, T5R3	testigo local, fertilización química	100 g fertilizante/ 20 L agua
T6R1, T6R2, T6R3	testigo absoluto, sin fertilización	Ninguno

ANEXO IV.
CÁLCULOS PARA REALIZAR CADA INOCULACIÓN DE
AZOTOBACTER SP.

Primera inoculación: 50 mL de *Azotobacter* sp. por planta * 45 plantas por Tratamiento = 2250 mL de solución por Tratamiento

Tratamiento 1: *Azotobacter* sp. cepa C7, concentración ajustada a 10^7 UFC/mL
Mezclar 25 mL de *Azotobacter* sp. cepa C7 concentración 3×10^9 UFC/mL en 2225 mL de Agua; para obtener 2250 mL de *Azotobacter* sp. cepa C7, concentración 10^7 UFC/mL

Tratamiento 2: *Azotobacter* sp. cepa C7, concentración ajustada a 10^6 UFC/mL
Mezclar 2,5 mL de *Azotobacter* sp. cepa C7 concentración 3×10^9 UFC/mL en 2247,5 mL de Agua; para obtener 2250 mL de *Azotobacter* sp. cepa C7, concentración 10^6 UFC/mL

Tratamiento 3: *Azotobacter* sp. cepa C7, concentración ajustada a 10^5 UFC/mL
Mezclar 2,5 mL de *Azotobacter* sp. cepa C7 concentración 3×10^9 UFC/mL en 22,5 mL de Agua; para obtener 25 mL de *Azotobacter* sp. cepa C7, concentración 10^8 UFC/mL
Mezclar 2,5 mL de *Azotobacter* sp. cepa C7 concentración 3×10^8 UFC/mL en 2247,5 mL de Agua; para obtener 2250 mL de *Azotobacter* sp. cepa C7, concentración 10^5 UFC/mL

Tratamiento 4: *Azotobacter* sp. cepa nativa de Quinindé, concentración ajustada a 10^6 UFC/mL
Mezclar 2,5 mL de *Azotobacter* sp. cepa nativa de Quinindé concentración 5×10^{11} UFC/mL en 22,5 mL de Agua; para obtener 25 mL de *Azotobacter* sp. cepa nativa de Quinindé, concentración 10^{10} UFC/mL

Mezclar 2,5 mL de *Azotobacter* sp. cepa nativa de Quinindé concentración 10^{10} UFC/mL en 22,5 mL de Agua; para obtener 25 mL de *Azotobacter* sp. cepa nativa de Quinindé, concentración 10^9 UFC/mL

Mezclar 2,5 mL de *Azotobacter* sp. cepa nativa de Quinindé concentración 10^9 UFC/mL en 2247,5 mL de Agua; para obtener 2250 mL de *Azotobacter* sp. cepa nativa de Quinindé, concentración 10^6 UFC/mL

Segunda inoculación: 75 mL de *Azotobacter* sp. por planta * 45 plantas por Tratamiento = 3375 mL de solución por Tratamiento

Tratamiento 1: *Azotobacter* sp. cepa C7, concentración ajustada a 10^7 UFC/mL

Mezclar 35 mL de *Azotobacter* sp. cepa C7 concentración 3×10^9 UFC/mL en 3340 mL de Agua; para obtener 3375 mL de *Azotobacter* sp. cepa C7, concentración 10^7 UFC/mL

Tratamiento 2: *Azotobacter* sp. cepa C7, concentración ajustada a 10^6 UFC/mL

Mezclar 3,5 mL de *Azotobacter* sp. cepa C7 concentración 3×10^9 UFC/mL en 3371,5 mL de Agua; para obtener 3375 mL de *Azotobacter* sp. cepa C7, concentración 10^6 UFC/mL

Tratamiento 3: *Azotobacter* sp. cepa C7, concentración ajustada a 10^5 UFC/mL

Mezclar 3,5 mL de *Azotobacter* sp. cepa C7 concentración 3×10^9 UFC/mL en 31,5 mL de Agua; para obtener 35 mL de *Azotobacter* sp. cepa C7, concentración 10^8 UFC/mL

Mezclar 3,5 mL de *Azotobacter* sp. cepa C7 concentración 3×10^8 UFC/mL en 3371,5 mL de Agua; para obtener 3375 mL de *Azotobacter* sp. cepa C7, concentración 10^5 UFC/mL

Tratamiento 4: *Azotobacter* sp. cepa nativa de Quinindé, concentración ajustada a 10^6 UFC/mL

Mezclar 3,5 mL de *Azotobacter* sp. cepa nativa de Quinindé concentración 5×10^{11} UFC/mL en 31,5 mL de Agua; para obtener 35 mL de *Azotobacter* sp. cepa nativa de Quinindé, concentración 10^{10} UFC/mL

Mezclar 3,5 mL de *Azotobacter* sp. cepa nativa de Quinindé concentración 10^{10} UFC/mL en 31,5 mL de Agua; para obtener 35 mL de *Azotobacter* sp. cepa nativa de Quinindé, concentración 10^9 UFC/mL

Mezclar 3,5 mL de *Azotobacter* sp. cepa nativa de Quinindé concentración 10^9 UFC/mL en 3371,5 mL de Agua; para obtener 3375 mL de *Azotobacter* sp. cepa nativa de Quinindé, concentración 10^6 UFC/mL

Tercera inoculación: 100 mL de *Azotobacter* sp. por planta * 45 plantas por Tratamiento = 4500 mL de solución por Tratamiento

Tratamiento 1: *Azotobacter* sp. cepa C7, concentración ajustada a 10^7 UFC/mL

Mezclar 50 mL de *Azotobacter* sp. cepa C7 concentración 3×10^9 UFC/mL en 4450 mL de Agua; para obtener 4500 mL de *Azotobacter* sp. cepa C7, concentración 10^7 UFC/mL

Tratamiento 2: *Azotobacter* sp. cepa C7, concentración ajustada a 10^6 UFC/mL

Mezclar 5 mL de *Azotobacter* sp. cepa C7 concentración 3×10^9 UFC/mL en 4495 mL de Agua; para obtener 4500 mL de *Azotobacter* sp. cepa C7, concentración 10^6 UFC/mL

Tratamiento 3: *Azotobacter* sp. cepa C7, concentración ajustada a 10^5 UFC/mL

Mezclar 5 mL de *Azotobacter* sp. cepa C7 concentración 3×10^9 UFC/mL en 45 mL de Agua; para obtener 50 mL de *Azotobacter* sp. cepa C7, concentración 10^8 UFC/mL

Mezclar 5 mL de *Azotobacter* sp. cepa C7 concentración 3×10^8 UFC/mL en 4495 mL de Agua; para obtener 4500 mL de *Azotobacter* sp. cepa C7, concentración 10^5 UFC/mL

Tratamiento 4: *Azotobacter* sp. cepa nativa de Quinindé, concentración ajustada a 10^6 UFC/mL

Mezclar 5 mL de *Azotobacter* sp. cepa nativa de Quinindé concentración 5×10^{11} UFC/mL en 45 mL de Agua; para obtener 50 mL de *Azotobacter* sp. cepa nativa de Quinindé, concentración 10^{10} UFC/mL

Mezclar 5 mL de *Azotobacter* sp. cepa nativa de Quinindé concentración 10^{10} UFC/mL en 45 mL de Agua; para obtener 50 mL de *Azotobacter* sp. cepa nativa de Quinindé, concentración 10^9 UFC/mL

Mezclar 5 mL de *Azotobacter* sp. cepa nativa de Quinindé concentración 10^9 UFC/mL en 4495 mL de Agua; para obtener 4500 mL de *Azotobacter* sp. cepa nativa de Quinindé, concentración 10^6 UFC/mL

Cuarta inoculación: 125 mL de *Azotobacter* sp. por planta * 45 plantas por Tratamiento = 5625 mL de solución por Tratamiento

Tratamiento 1: *Azotobacter* sp. cepa C7, concentración ajustada a 10^7 UFC/mL

Mezclar 60 mL de *Azotobacter* sp. cepa C7 concentración 3×10^9 UFC/mL en 5565 mL de Agua; para obtener 5625 mL de *Azotobacter* sp. cepa C7, concentración 10^7 UFC/mL

Tratamiento 2: *Azotobacter* sp. cepa C7, concentración ajustada a 10^6 UFC/mL

Mezclar 6 mL de *Azotobacter* sp. cepa C7 concentración 3×10^9 UFC/mL en 5619 mL de Agua; para obtener 5625 mL de *Azotobacter* sp. cepa C7, concentración 10^6 UFC/mL

Tratamiento 3: *Azotobacter* sp. cepa C7, concentración ajustada a 10^5 UFC/mL

Mezclar 1 mL de *Azotobacter* sp. cepa C7 concentración 3×10^9 UFC/mL en 9 mL de Agua; para obtener 10 mL de *Azotobacter* sp. cepa C7, concentración 10^8 UFC/mL

Mezclar 6 mL de *Azotobacter* sp. cepa C7 concentración 3×10^8 UFC/mL en 5619 mL de Agua; para obtener 5625 mL de *Azotobacter* sp. cepa C7, concentración 10^5 UFC/mL

Tratamiento 4: *Azotobacter* sp. cepa nativa de Quinindé, concentración ajustada a 10^6 UFC/mL

Mezclar 1 mL de *Azotobacter* sp. cepa nativa de Quinindé concentración 5×10^{11} UFC/mL en 9 mL de Agua; para obtener 10 mL de *Azotobacter* sp. cepa nativa de Quinindé, concentración 10^{10} UFC/mL

Mezclar 1 mL de *Azotobacter* sp. cepa nativa de Quinindé concentración 10^{10} UFC/mL en 9 mL de Agua; para obtener 10 mL de *Azotobacter* sp. cepa nativa de Quinindé, concentración 10^9 UFC/mL

Mezclar 6 mL de *Azotobacter* sp. cepa nativa de Quinindé concentración 10^9 UFC/mL en 5619 mL de Agua; para obtener 5625 mL de *Azotobacter* sp. cepa nativa de Quinindé, concentración 10^6 UFC/mL

ANEXO V

RESULTADOS DEL ANÁLISIS DE NITRÓGENO TOTAL,

REALIZADO EN LA ESTACIÓN EXPERIMENTAL “SANTA

CATALINA” DEL INIAP

IN I A P

INSTITUTO NACIONAL AUTÓNOMO DE INVESTIGACIONES AGROPECUARIAS

ESTACION EXPERIMENTAL "SANTA CATALINA"
Laboratorio de Análisis Químico de Suelos y Plantas

Nombre del propietario:
Nombre del remitente:
Dirección
Nombre de la Granja
Localización

JUAN JOSE EGAS YEROVI
ING. JOSE VELASQUEZ
ESMERALDAS
CENTRO DE ACOPIO BPS-BOTROSA
MALIMPIA QUININDE ESMERALDAS
Parroquia Caniñon Provincia

Fecha de muestreo:
Muestra:

06-04-09
CACACO

Fecha ingreso Laboratorio:
Fecha de entrega

06-04-09
17-04-09

RESULTADOS DE ANÁLISIS DE HUMEDAD

No. Laboratorio	Identificación Muestra	% N	Peso muestra		Materia Seca %
			húmeda	Seca	
14063	T1 R1	1.23	37.70	8.90	23.70
14064	T1 R2	0.93	38.80	12.60	32.50
14065	T1 R3	1.30	42.30	10.70	25.30
14066	T2 R1	1.15	33.30	8.80	26.40
14067	T2 R2	1.08	35.70	8.60	24.10
14068	T2 R3	1.15	49.00	14.0	28.60
14069	T3 R1	1.44	31.40	6.5	20.70
14070	T3 R2	1.08	34.90	4.80	13.80
14071	T3 R3	1.08	39.20	11.40	29.10
14072	T4 R1	1.01	40.20	11.30	28.10
14073	T4 R2	1.23	31.70	8.0	25.20
14074	T4 R3	0.87	41.70	12.50	30.0
14075	T5 R1	1.01	39.30	10.60	27.0
14076	T5 R2	1.08	31.10	7.90	25.40
14077	T5 R3	1.23	36.20	9.90	27.40
14078	T6 R1	1.01	22.80	7.0	30.70
14079	T6 R2	1.15	25.50	6.60	25.90
14080	T6 R3	1.08	28.40	7.70	27.10


JEFE DE LABORATORIO


LABORATORISTA

ANEXO VI
FOTOGRAFÍAS DEL PROCESO DE AISLAMIENTO DE
***AZOTOBACTER* EN LABORATORIO**



Primera dilución de las muestras de suelo



Segunda y tercera dilución de las muestras de suelo



Siembra de las diluciones en medio Ashby



Culminación de la siembra

ANEXO VII
PRESENTACIÓN DEL BIOFERTILIZANTE DESPUÉS DE LA
PROPAGACIÓN



Biofertilizante *Azotobacter* sp., presentación líquida, botellas de 1 litro

ANEXO VIII
VIVERO DE CACAO, ÁREA DONDE SE REALIZÓ EL
EXPERIMENTO Y DISPOSICIÓN DE LOS TRATAMIENTOS





