

UNIVERSIDAD DE COSTA RICA
FACULTAD DE CIENCIAS AGROALIMENTARIAS
ESCUELA DE AGRONOMÍA

Efecto de tres formulaciones de *Azospirillum brasilense* (Tarrand, Krieg & Döbereiner)
sobre el crecimiento de arroz (*Oryza sativa* L.) bajo condiciones de invernadero

María Gabriela Alfaro Quesada

TESIS PARA OPTAR AL TÍTULO PROFESIONAL DE INGENIERA AGRÓNOMA
CON EL GRADO DE LICENCIADA EN AGRONOMÍA

2023

Efecto de tres formulaciones de *Azospirillum brasilense* (Tarrand, Krieg & Döbereiner)
sobre el crecimiento de arroz (*Oryza sativa* L.) bajo condiciones de invernadero

María Gabriela Alfaro Quesada

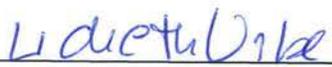
TESIS PARA OPTAR AL TÍTULO PROFESIONAL DE INGENIERA AGRÓNOMA
CON EL GRADO DE LICENCIADA EN AGRONOMÍA

UNIVERSIDAD DE COSTA RICA
FACULTAD DE CIENCIAS AGROALIMENTARIAS
ESCUELA DE AGRONOMÍA
2023

Efecto de tres formulaciones de *Azospirillum brasilense* (Tarrand, Krieg & Döbereiner)
sobre el crecimiento de arroz (*Oryza sativa* L.) bajo condiciones de invernadero

María Gabriela Alfaro Quesada

TESIS PARA OPTAR AL TÍTULO PROFESIONAL DE INGENIERA AGRÓNOMA
CON EL GRADO DE LICENCIADA EN AGRONOMÍA



Lidieth Uribe Lorío, Dra.

DIRECTORA DE TESIS



Leida Castro Barquero, Lic.

MIEMBRO DEL TRIBUNAL



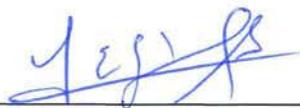
María del Milagro Granados Montero, Dra.

MIEMBRO DEL TRIBUNAL



Andrés Antonio Monge Vargas, Dr.

MIEMBRO DEL TRIBUNAL



Luis Gómez Alpízar, Dr.

DIRECTOR DE ESCUELA



María Gabriela Alfaro Quesada, Bach.

SUSTENTANTE

AGRADECIMIENTO

Agradezco a Dios por ser mi fuerza y sabiduría en mis años de estudio y por ayudarme a salir adelante.

A la Dra. Lidieth Uribe, por brindarme la oportunidad de desarrollar este trabajo, por ser mi guía y ayuda en su desarrollo.

A los miembros del Comité Asesor por aportar ideas para enriquecer este trabajo.

A todo el personal del laboratorio de Microbiología Agrícola del Centro de Investigaciones Agronómicas, por orientarme y ayudarme en todo momento.

Agradezco a los compañeros de trabajo del Hospital, que siempre creyeron en mí y me brindaron ayuda cuando más lo necesité.

A la Universidad de Costa Rica, por ser una institución que vela por brindar una educación de calidad y ha sido mi casa durante estos años.

DEDICATORIA

A mi Familia por su apoyo y ayuda durante mis años de estudio, principalmente a mi madre Sandra Quesada por acompañarme en los momentos más difíciles y ser mi mejor amiga.

Tabla de contenido

1. INTRODUCCIÓN	1
2. OBJETIVOS	3
2.1. Objetivo general	3
2.2. Objetivos específicos	3
3. REVISIÓN DE LITERATURA	3
3.1. Fertilización biológica.....	3
3.2. Tipos de inoculantes y acarreadores	4
3.3. Bacterias promotoras de crecimiento vegetal.....	5
3.4. Características del género <i>Azospirillum</i>	5
3.5. <i>Azospirillum brasilense</i> como inoculante	6
3.6. Empleo de <i>Azospirillum brasilense</i> en el cultivo de arroz.....	7
4. METODOLOGÍA	9
4.1. Localización del trabajo	9
4.2. Material Experimental.....	9
4.3. Ensayos y Tratamientos	9
4.4. Preparación de los inoculantes	11
4.4.1. Inoculante medio de melaza	11
4.4.2 Inoculante a base de vermicompost.....	12
4.4.3. Inoculante liofilizado de <i>A. brasilense</i>	12
4.4.4. Inoculación de arroz con <i>A. brasilense</i>	13
4.4.5. Recuento en plato de cada una de las formulaciones	13
4.4.6. Siembra del ensayo.....	14
4.5. Diseño experimental.....	15
4.6. Análisis estadístico de los datos	15
4.7. Condiciones de temperatura y humedad relativa del ensayo.	15
5. RESULTADOS	16
5.1 Preparación de los inoculantes	16

5.2. Inoculación de arroz con <i>A. brasilense</i>	17
5.2.1. Inoculante líquido de melaza.....	17
5.2.2. Inoculante vermicompost	21
5.2.3. Inoculante liofilizado.....	25
6. DISCUSIÓN	28
6.1. Formulación de los inoculantes.....	28
6.2. Efecto de la Inoculación de <i>A. brasilense</i> en arroz a los 90 días.	29
6.2.1. Inoculante líquido de melaza.....	29
6.2.2. Inoculante vermicompost	31
6.2.3. Inoculante liofilizado.....	32
7. CONCLUSIONES	34
8. RECOMENDACIONES	35
9. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	35
10. ANEXOS	45

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Ensayos, tratamientos y nomenclatura utilizada en la determinación del efecto de las tres formulaciones con concentraciones crecientes de *A. brasilense* sobre el crecimiento de plantas de arroz (*Oryza sativa* L.) variedad Palmar 18, a nivel de invernadero.....10.

Cuadro 2. Concentración de los inoculantes líquidos y liofilizados a los cuatro días de crecimiento, mediante plateo en el medio Ácido Málico Rojo Congo.....17.

ÍNDICE DE FIGURAS

- Figura 1.** Temperatura y humedad relativa máxima y mínima durante el periodo de desarrollo del ensayo en el invernadero del Centro de Investigaciones Agronómicas. 16
- Figura 2.** Efecto de la concentración de *Azospirillum* en el inoculante líquido de melaza sobre la altura de las plantas de arroz de la variedad Palmar 18 bajo condiciones de invernadero, en los distintos momentos de medición a los 30, 60 y 90 días después de la siembra. Las barras de error representan la variabilidad en la medición de los datos. 18
- Figura 3.** Efecto de la concentración de *Azospirillum* en el inoculante líquido de melaza sobre la longitud de raíz de las plantas de arroz de la variedad Palmar 18 bajo condiciones de invernadero. La numeración 7, 8 y 9 corresponden a las concentraciones 10^7 , 10^8 y 10^9 UFC/ml respectivamente. Letras diferentes significan tratamientos estadísticamente distintos según la prueba de LSD ($p < 0,05$). Las barras de error representan la variabilidad en la medición de los datos. 18
- Figura 4.** Efecto de la concentración de *Azospirillum* en el inoculante líquido de melaza sobre el peso fresco y seco de la parte aérea de las plantas de arroz de la variedad Palmar 18 bajo condiciones de invernadero. La numeración 7, 8 y 9 corresponden a las concentraciones 10^7 , 10^8 y 10^9 UFC/ml respectivamente. Letras diferentes significan tratamientos estadísticamente distintos según la prueba de LSD ($p < 0,05$). Las barras de error representan la variabilidad en la medición de los datos. 19
- Figura 5.** Efecto de la concentración de *Azospirillum* en el inoculante líquido de melaza sobre el peso fresco y seco de la raíz de las plantas de arroz de la variedad Palmar 18 bajo condiciones de invernadero. La numeración 7, 8 y 9 corresponden a las concentraciones 10^7 , 10^8 y 10^9 UFC/ml respectivamente. Letras diferentes significan tratamientos estadísticamente distintos según la prueba de LSD ($p < 0,05$). Las barras de error representan la variabilidad en la medición de los datos. 20
- Figura 6.** Efecto de la concentración de *Azospirillum* en el inoculante líquido de melaza sobre la relación raíz/tallo de las plantas de arroz de la variedad Palmar 18 bajo condiciones de

invernadero. La numeración 7, 8 y 9 corresponden a las concentraciones 10^7 , 10^8 y 10^9 UFC/ml respectivamente. Letras diferentes significan tratamientos estadísticamente distintos según la prueba de LSD ($p < 0,05$). Las barras de error representan la variabilidad en la medición de los datos.21

Figura 7. Efecto de la concentración de *Azospirillum* en el inoculante de vermicompost sobre la altura de las plantas de arroz de la variedad Palmar 18 bajo condiciones de invernadero, en los distintos momentos de medición a los 30, 60 y 90 días después de la siembra. Las barras de error representan la variabilidad en la medición de los datos.22

Figura 8. Efecto de la concentración de *Azospirillum* en el inoculante de vermicompost sobre la longitud de raíz de las plantas de arroz de la variedad Palmar 18 bajo condiciones de invernadero. La numeración 7, 8 y 9 corresponden a las concentraciones 10^7 , 10^8 y 10^9 UFC/g respectivamente. Las barras de error representan la variabilidad en la medición de los datos.22

Figura 9. Efecto de la concentración de *Azospirillum* en el inoculante de vermicompost sobre el peso fresco y seco aéreo de las plantas de arroz de la variedad Palmar 18 bajo condiciones de invernadero. La numeración 7, 8 y 9 corresponden a las concentraciones 10^7 , 10^8 y 10^9 UFC/g respectivamente. Letras diferentes significan tratamientos estadísticamente distintos según la prueba de LSD ($p < 0,05$). Las barras de error representan la variabilidad en la medición de los datos.....23

Figura 10. Efecto de la concentración de *Azospirillum* en el inoculante de vermicompost sobre el peso fresco y seco de raíz de las plantas de arroz de la variedad Palmar 18 bajo condiciones de invernadero. La numeración 7, 8 y 9 corresponden a las concentraciones 10^7 , 10^8 y 10^9 UFC/g respectivamente. Las barras de error representan la variabilidad en la medición de los datos.24

Figura 11. Efecto de la concentración de *Azospirillum* en el inoculante de vermicompost sobre la relación raíz/tallo de las plantas de arroz de la variedad Palmar 18 bajo condiciones de invernadero. La numeración 7, 8 y 9 corresponden a las concentraciones 10^7 , 10^8 y 10^9 UFC/g respectivamente. Las barras de error representan la variabilidad en la medición de los datos.24

Figura 12. Efecto de la concentración de *Azospirillum* en el inoculante liofilizado sobre la altura de las plantas de arroz de la variedad Palmar 18 bajo condiciones de invernadero, en los distintos momentos de medición a los 30, 60 y 90 días después de la siembra. Las barras de error representan la variabilidad en la medición de los datos.....25

Figura 13. Efecto de la concentración de *Azospirillum* en el inoculante liofilizado sobre la longitud de raíz de las plantas de arroz de la variedad Palmar 18 bajo condiciones de invernadero. La numeración 7, 8 y 9 corresponden a las concentraciones 10^7 , 10^8 y 10^9 UFC/ml respectivamente. Letras diferentes significan tratamientos estadísticamente distintos según la prueba de LSD ($p < 0,05$). Las barras de error representan la variabilidad en la medición de los datos.26

Figura 14. Efecto de la concentración de *Azospirillum* en el inoculante liofilizado sobre el peso fresco y seco aéreo de las plantas de arroz de la variedad Palmar 18 bajo condiciones de invernadero. La numeración 7, 8 y 9 corresponden a las concentraciones 10^7 , 10^8 y 10^9 UFC/ml respectivamente. Letras diferentes significan tratamientos estadísticamente distintos según la prueba de LSD ($p < 0,05$). Las barras de error representan la variabilidad en la medición de los datos.27

Figura 15. Efecto de la concentración de *Azospirillum* en el inoculante liofilizado sobre el peso fresco y seco de raíz de las plantas de arroz de la variedad Palmar 18 bajo condiciones de invernadero. La numeración 7, 8 y 9 corresponden a las concentraciones 10^7 , 10^8 y 10^9 UFC/ml respectivamente. Letras diferentes significan tratamientos estadísticamente distintos según la prueba de LSD ($p < 0,05$). Las barras de error representan la variabilidad en la medición de los datos.....27

Figura 16. Efecto de la concentración de *Azospirillum* en el inoculante liofilizado sobre la relación raíz/tallo de las plantas de arroz de la variedad Palmar 18 bajo condiciones de invernadero. La numeración 7, 8 y 9 corresponden a las concentraciones 10^7 , 10^8 y 10^9 UFC/ml respectivamente. Las barras de error representan la variabilidad en la medición de los datos.28

RESUMEN

El cultivo del arroz depende actualmente en gran medida de la fertilización química, pero el uso desmedido de este insumo trae como consecuencia contaminación ambiental y daños a la salud humana. Una alternativa ante este hecho es la utilización de biofertilizantes a base de bacterias promotoras de crecimiento vegetal entre ellas *Azospirillum brasilense*, una bacteria con propiedades que potencializan el crecimiento de las plantas. En el presente trabajo se evaluó el efecto de *Azospirillum brasilense* sobre el crecimiento de plantas de arroz a nivel de invernadero mediante tres ensayos en los que se utilizó tres tipos de inoculantes: medio líquido de melaza, vermicompost y una suspensión bacteriana sometida a un proceso de liofilización (criodesecación), en combinación con tres concentraciones de *A. brasilense* 10^7 , 10^8 y 10^9 UFC, además un tratamiento testigo sin inocular. Se evaluó la altura del tallo, longitud de raíz, peso fresco y seco de la parte aérea y radicular, así como la relación entre la raíz/tallo. Se observó que al inocular el arroz con el medio líquido de melaza presentó una tendencia positiva en el crecimiento de las plantas, con pesos frescos aéreos superiores de hasta un 37% (1,6 g) respecto al testigo, la concentración de 10^8 y 10^9 UFC/ml evidenciaron pesos frescos de raíz mayores a un 32% (1,5 g) en relación con el tratamiento de menor concentración 10^7 UFC/ml, se obtuvo un 52% más que el tratamiento testigo (2,5 g). De igual forma, para la relación raíz/tallo, la concentración 10^8 UFC/ml con respecto al testigo y la concentración de 10^7 UFC/ml, fue superior hasta un 40% (0,29), no diferenciándose estadísticamente del tratamiento 10^9 UFC/ml. En el inoculante vermicompost en la concentración de 10^8 UFC/g se evidenció un peso fresco inferior de hasta un 31% menor (1,5 g) a los otros tratamientos inoculados con la bacteria y el testigo. Para el caso del inoculante liofilizado, el tratamiento a 10^9 UFC/ml presentó un peso fresco aéreo y de raíz de hasta un 22% (0,85 g) y un 41% (1,99 g) respectivamente menor en comparación a las otras concentraciones y el testigo, en la evaluación de las otras variables de medición no hubo diferencia significativa referente al testigo.

1. INTRODUCCIÓN

El arroz es uno de los principales productos de consumo en el país, principalmente entre los sectores más pobres de la población, ya que es la base de su dieta cotidiana (Petrecolli, 2006). El arroz constituye una gran fuente de energía por su alto contenido de hidratos de carbono y almidón, es un alimento que aporta a la dieta minerales esenciales como el calcio y el hierro, además de vitaminas como tiamina, riboflavina y niacina, con un bajo contenido de grasas (Moquete, 2010).

En el periodo 2020/2021 se sembraron 33 668 ha de arroz, concentrándose su producción en la región Chorotega (62 %), seguido por la región del Pacífico Central (14 %), región Brunca (14 %) y Huetar Norte (9 %). La producción nacional de arroz fue de 152 721 t en granza seca y limpia. El consumo aparente de arroz de este periodo fue de 234 256 t de arroz pilado, de los cuales el 43 % se cubrió con arroz nacional, mientras que el 57 % restante con arroz importado (Corporación Arrocería Nacional, 2021).

La forma tradicional para suplir las necesidades de nitrógeno en el cultivo de arroz es la fertilización química, sin embargo, la aplicación inadecuada de este insumo constituye una fuente de contaminación al suelo y el agua, ya que la cantidad de nitrógeno aplicado al cultivo está expuesto a sufrir pérdidas de hasta un 67 %, liberando al ambiente un exceso de compuestos nitrogenados; aunado a esto el incremento en el precio de los fertilizantes de casi un 70%, dificulta el suministro adecuado de este elemento al cultivo (García et al., 2010; Wiggins, 2020; Alfaro, 2022). Una alternativa para reducir el uso de este insumo es la utilización de fertilizantes biológicos.

Un biofertilizante se define como una formulación a base de microorganismos, que promueven el crecimiento de las plantas, mejorando el aporte y la disponibilidad de nutrientes (Cerna et al., 2021). Los biofertilizantes se pueden producir a partir de rizobacterias promotoras del crecimiento de las plantas (PGPR), que contribuyen a mejorar la salud y nutrición vegetal por diferentes mecanismos como la tolerancia al estrés, solubilización de nutrientes, fijación de nitrógeno, producción de reguladores de crecimiento vegetal, sideróforos, compuestos orgánicos volátiles y enzimas protectoras como la quitinasa,

glucanasa, y 1-aminociclopropano-1-carboxilato desaminasa (Chávez et al., 2018; Guimarães et al., 2020).

Entre los factores que se deben considerar para la producción de un biofertilizante es que el proceso de cultivo del microorganismos sea eficiente y de calidad, que el medio utilizado para contenerlo, líquido o sólido, tenga la capacidad de mantener viables las poblaciones microbianas deseables por un periodo definido, que sea seguro, fácil de producir y formular, que el inoculante microbiano sea competitivo en la rizosfera y efectivo para el desarrollo y crecimiento de las plantas, bajo las condiciones ambientales en el campo (Beltrán et al., 2022). Algunos bioinoculantes que se comercializan actualmente utilizan bacterias de los géneros *Azospirillum*, *Azotobacter* y *Bacillus* (Dellagi et al., 2020).

La bacteria *Azospirillum brasilense* tiene la capacidad de promover el crecimiento de las plantas (Licea et al., 2020; Koul et al., 2021). Entre sus efectos, al ser inoculada en gramíneas, se encuentran el aumento en la materia seca total, mayor altura de la planta, concentración de nitrógeno en el follaje, incremento en el rendimiento del grano por hectárea y mayor desarrollo en el sistema radical; todo ello debido a que *Azospirillum* tiene la capacidad de fijar nitrógeno, producir hormonas de crecimiento vegetal o fitohormonas como el ácido indolacético, auxinas, citoquininas, giberelinas y etileno (Licea et al., 2020).

Para obtener una respuesta positiva en la planta, se requiere de un umbral adecuado de número de células del microorganismo, por lo que los inoculantes deben diseñarse para proporcionar una fuente confiable de bacterias que sobrevivan en el suelo y estén disponibles para los cultivos en el momento que lo requieran. Para el caso de *Azospirillum brasilense* se requiere entre 10^6 y 10^7 bacterias/ml para observar su efecto en la planta (Bashan et al., 2014). Sin embargo, bajo condiciones controladas la inoculación de varias cepas de *A. brasilense* a una concentración de 10^9 UFC/ml sobre semillas de arroz, demostró ser eficiente sobre el crecimiento de las plantas, mayor altura de tallo, longitud de raíz y peso seco de raíz (Puente et al., 2013), mientras que la inoculación de esta bacteria a la misma concentración pero en plántulas de arroz, logró mejorar la altura de planta, número de granos por espiga y rendimiento de la planta en relación al tratamiento testigo (Llerena et al., 2021).

Para determinar si existe un efecto de la concentración de *Azospirillum* sobre la respuesta de las plantas de arroz a la inoculación, se estudiaron tres formulaciones distintas con concentraciones crecientes de la bacteria.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo general

- Determinar el efecto de *Azospirillum brasilense* formulado como inoculante líquido, inoculante a base de vermicompost y liofilizado, a diferentes concentraciones de la bacteria, sobre el crecimiento de arroz de la variedad Palmar 18, bajo condiciones de invernadero.

2.2. Objetivos específicos

- Estimar el efecto de tres concentraciones de un inoculante líquido a base de *Azospirillum brasilense* sobre el crecimiento de arroz de la variedad Palmar 18, bajo condiciones de invernadero.
- Comparar el efecto de tres concentraciones de un inoculante a base de vermicompost y de tres concentraciones de un inoculante liofilizado, sobre el crecimiento de arroz de la variedad Palmar 18, bajo condiciones de invernadero.

3. REVISIÓN DE LITERATURA

3.1. Fertilización biológica

El exceso en el uso de fertilizantes nitrogenados causa lixiviación hacia las vías fluviales y mantos acuíferos, lo que provoca eutrofización, aumenta el pH del agua y daños en los ecosistemas y la salud humana. Un exceso de nitrato en el agua potable puede inducir hipertensión, discapacidades congénitas, daños al sistema nervioso infantil, entre otros (Wiggins, 2020). Los biofertilizantes a base de bacterias promotoras de crecimiento vegetal (BPCV), constituyen una alternativa para reducir el uso de fertilizantes químicos nitrogenados, al fomentar el crecimiento de las plantas mediante mecanismos como la solubilización de fosfatos, fijación biológica de nitrógeno y producción de hormonas, lo que

aumenta su actividad enzimática y favorece el desarrollo radical (De-Bashan et al., 2007; Fukami et al., 2016; Sangoquiza et al., 2018).

Un biofertilizante es una preparación que contiene microorganismos benéficos, destinados a la aplicación en semillas o al suelo, para suplementar nutrientes como el nitrógeno y el fósforo (Brahmaprakash et al., 2012). El uso prolongado de biofertilizantes mejora sustancialmente la fertilidad del suelo, eleva el rendimiento de los cultivos no leguminosos entre 10 y 40 %, aumenta la población de microorganismos en el suelo, incrementa el contenido de proteínas, aminoácidos, vitaminas y fijación de nitrógeno en las plantas (Mahanty et al., 2017).

3.2. Tipos de inoculantes y acarreadores

Un inoculante se refiere al producto final de la formulación que contiene un vehículo (sustrato abiótico sólido, líquido o gel) y un agente bacteriano o consorcio de microorganismos que promueven el crecimiento de las plantas, agregados directamente a la semilla o al suelo (Owen et al., 2015). Los inoculantes deben presentar tres características fundamentales: sustentar el crecimiento de los microorganismos, mantener el número necesario de células microbianas viables en buenas condiciones fisiológicas durante un tiempo aceptable y contener una carga suficiente de microorganismos en el momento de la inoculación, para alcanzar un umbral de número de bacterias que, generalmente se requiere para obtener una respuesta en la planta (Bashan et al., 2014).

La formulación de inoculantes se puede clasificar en líquidos y sólidos (Viñals et al., 1999; Bashan et al., 2014).

Inoculante líquido: son cultivos microbianos que contienen sustancias adherentes, estabilizadores para aumentar su vida útil y surfactantes para prevenir agregados celulares en el momento de realizar la inoculación de semillas o sustratos (Bashan et al., 2014).

Inoculante sólido: son microorganismos que permanecen retenidos sobre un acarreador sólido, lo que facilita su manipulación y almacenamiento e incrementan su vida útil, generalmente son polvos secos, geles de polisacáridos, agar, agarosa y alginato; también se utiliza material orgánico como turba, carbón, materiales inertes como roca, vermiculita,

perlita, arcilla y silicatos como mica, caolín y cultivos microbianos liofilizados simples (Bashan et al., 2014).

La liofilización corresponde a una técnica utilizada para el resguardo de microorganismos, el proceso consiste en extraer el agua congelada por sublimación, bajo condiciones de vacío, pasando del estado sólido al gaseoso, las bacterias sometidas bajo esta técnica pueden permanecer en un lugar fresco a temperatura ambiente por más de 20 años. Cuando se requiere utilizar los organismos liofilizados se reactiva hidratando la cepa resguardada, en algunas ocasiones las células pueden sufrir algún tipo de daño, por lo que se utilizan lipo-protectores o azúcares para su protección (Hernández, 2018).

3.3. Bacterias promotoras de crecimiento vegetal

Las BPCV de acuerdo con su efecto se pueden agrupar en dos modalidades. Las que ejercen acción directa sobre la fisiología de las plantas promoviendo su crecimiento, como por ejemplo incrementando la fijación de nitrógeno, la solubilización de minerales como el fósforo y otros nutrientes a través de la producción de sideróforos y de fitohormonas. A aquellas que mitigan una condición de estrés dado por factores bióticos, como las enfermedades o por condiciones ambientales como metales pesados, salinidad y sequía (Lagner, 2017). Entre las BPCV se encuentran las rizobacterias, los géneros más utilizados son *Azospirillum*, *Pseudomonas* y *Azotobacter* (Gamarelo et al., 2011; Castellano et al., 2015; Lagler, 2017).

3.4. Características del género *Azospirillum*

Azospirillum es un género de bacterias de vida libre, Gram negativa, con forma celular de bacilos, ligeramente curvos, presentan un diámetro de $1,0 \mu\text{m} \times 2,1 - 3,8 \mu\text{m}$, poseen movilidad en espiral, poseen flagelos y contienen cantidades elevadas (hasta el 50% del peso seco celular) de poli- β hidroxibutirato (PHB), un polímero de origen natural. A nivel morfológico, se caracteriza por presentar colonias en forma circular ovoide, con paredes gruesas, similares a quistes; superficie rugosa y brillante, de bordes ondulados, consistencia cremosa, que adquieren una coloración rojo oscuro o escarlata por absorción del colorante rojo congo en el medio de cultivo (Aguilar, 2020).

El género *Azospirillum* crece con mayor abundancia a temperaturas entre 28 y 38 °C y a un pH entre 7 y 8 (Sangoquiza et al., 2018). Estas bacterias tienen la capacidad de crecer autotróficamente con H₂ y CO₂, por medio de la enzima Ribulosa 1-5 difosfato carboxilasa, utilizan como fuente de crecimiento monosacáridos y disacáridos, alcoholes polihidroxilados y diferentes ácidos orgánicos como ácido málico, succínico y algunos aminoácidos (García et al., 2019).

3.5. *Azospirillum brasilense* como inoculante

Desde 1976 hasta finales de la década de 1980, se realizaron ensayos de campo en muchos países para probar los efectos de los inoculantes de *Azospirillum* sobre la acumulación, crecimiento y rendimiento de nitrógeno en cultivos herbáceos (Andrew et al., 2003). La primera especie de *Azospirillum* se aisló en Holanda a partir de suelos arenosos pobres en nitrógeno, por el investigador Beijerinck quien la llamó *Spirillum lipoferum*, posteriormente se aisló de pastos marinos secos en Indonesia, desde entonces *Azospirillum* se ha aislado de la rizosfera de numerosos pastos (Castellano et al., 2015).

La inoculación de *A. brasilense* estimula en la planta la producción de fitohormonas como el ácido indolacético (IAA), citoquininas y giberelinas, lo que fomenta el crecimiento radical, mayor absorción de agua y minerales, así como una mayor tolerancia a la salinidad y sequía, ya que incrementa la conductancia estomática, la elasticidad de la pared celular, los pigmentos fotosintéticos como la clorofila a y b, los pigmentos fotoprotectores como violaxantina, zeaxantina, aeroxantina, luteína, neoxantina y betacaroteno, lo que aumenta la producción de biomasa (Galindo et al., 2016).

Azospirillum es una bacteria diazótropa (capaz de fijar nitrógeno atmosférico) y endófito facultativa, debido a que algunas especies tienen la capacidad de penetrar en la raíz y colonizar espacios intercelulares. La fijación biológica de nitrógeno es posible gracias a la actividad del complejo enzimático llamado nitrogenasa, que está constituido por dos proteínas: la proteína (I), llamada molibdeno-hierro-proteína, y la proteína (II), llamada hierro-proteína, en el proceso participan también las proteínas: ferredoxina y flavodoxina, que actúan como donadores de electrones y reductores de la nitrogenasa. Los electrones son transportados a la nitrogenasa por la ferredoxina y llegan a la hierro-proteína, esta activa a la

Mo-Fe-proteína y se produce la reducción de nitrógeno, para luego ser fijado como compuesto aminado, es decir, el nitrógeno de la atmósfera es reducido a amoníaco, para luego ser transformado en moléculas como nitritos y ser incorporados por las plantas para la formación de biomoléculas esenciales (Hernández, 2018; Aguilar, 2020).

La inoculación de *A. brasilense* con una concentración de 1×10^8 UFC/ml en 27 genotipos de maíz (Zeffa et al. 2019), incrementó la producción de la hormona vegetal ácido indol-3-acético (AIA), lo cual aumentó la biomasa de la planta y modificó la arquitectura radicular, mayor longitud de raíz, formación de raíces adventicias y pelos radicales.

3.6. Empleo de *Azospirillum brasilense* en el cultivo de arroz

En Costa Rica existen más de 12 variedades de arroz, de las cuales la variedad Palmar 18 es la cuarta variedad más utilizada por el sector arrocero, con un 6,83 % del área sembrada en el país (CONARROZ, 2022). Esta variedad tiene un ciclo de desarrollo de 110 a 120 días, se caracteriza por poseer un porte alto de aproximadamente 105 cm, un grano largo con buena calidad molinera y puede ser cultivado bajo los dos sistemas de siembra (secano o inundado), con un rendimiento aproximado de 5 a 8 t/ha. Es una variedad tolerante a enfermedades como acame, *Piricularia* sp., *Helminthosporium* sp. y virus de la hoja blanca, mientras que resulta susceptible a *Rhizoctonia* sp., *Sarocladium* sp. y *Pseudomonas* sp. (Chavarría, 2011; CONARROZ, 2021).

El cultivo de arroz requiere de un manejo intensivo, por lo que la estructura del suelo, la porosidad y el contenido de materia orgánica se reducen, lo que afecta la retención y liberación de nutrientes (Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura, FAO, 2016). Las variedades de alto rendimiento requieren grandes cantidades de nutrientes y nitrógeno para su crecimiento, desarrollo y producción de grano, se estima que el cultivo de arroz requiere 1 kg de nitrógeno para producir de 15 a 20 kg de grano. Este debe aplicarse considerando la etapa fenológica en la que se encuentra el cultivo, en el macollamiento se aplica un 50 % del nitrógeno requerido durante todo su ciclo, mientras que, en el periodo de diferenciación floral, se aplica el restante 50 %, para la formación de hijos productivos (Roy et al., 2015; Vignola et al., 2018).

La fuente de nitrógeno más utilizada es la urea, pero la planta utiliza menos del 50% de este recurso, el otro restante se pierde en procesos de volatilización del NH_4 , la desnitrificación y las pérdidas por lixiviación, que genera a través del tiempo gases de efecto invernadero como el óxido nitroso (N_2O), el óxido nítrico (NO) y el amoníaco (NH_3) y la lixiviación de NO_3 provoca la toxicidad en las aguas subterráneas (Roy et al., 2015)

La utilización de *Azospirillum* sp. en arroz ha mostrado resultados positivos, ya que aplicaciones de la bacteria aumenta el crecimiento del sistema radical de la planta entre un 25 y 34 %, lo que parece indicar que existe una interacción específica entre ambos (Chaman et al., 2012). Resultados similares se encontraron en un estudio realizado por Ullah et al. (2014) con tres cepas bacterianas *A. brasilense*, *A. lipoferum*, *Pseudomonas*, donde se obtuvo un incremento del área radical, longitud de raíz, número de macollas y rendimiento del grano, en comparación con las plantas no inoculadas; el tratamiento con *A. brasilense* influyó más sobre el crecimiento vegetal que las otras cepas.

Lo anterior concuerda con una investigación realizada a nivel de invernadero, donde al inocular una cepa nativa de *Azospirillum* (A5) a una concentración de 10^5 UFC/ml sobre plantas de arroz, los resultados reflejaron un incremento en el peso de granos/planta, similar al tratamiento comercial con urea (120 kg/ha) de 3,90 y 3,74 g/planta respectivamente, mientras que los otros tratamientos presentaron un peso inferior en los granos (testigo, 10^6 y 10^8 UFC/ ml), esto sugiere que el aporte de nitrógeno proporcionado por la bacteria a dicha concentración, es semejante al ofrecido por el fertilizante químico, demostrado la eficiencia en el uso de *Azospirillum* (Lara et al., 2013). Resultados similares fueron encontrados por Thomas et al. (2019) al inocular *A. brasilense* bajo condiciones controladas, a una concentración de 10^8 bacterias/ml, sobre raíces de plántulas de arroz con siete días de desarrollo, en este caso las plantas presentaron un incremento de la masa total y de la raíz de 1,26 y 1,63 veces respectivamente, con respecto a las plantas no inoculadas con la bacteria.

Al comparar diferentes rizobacterias promotoras de crecimiento, Aguirre (2018) encontró que el tratamiento inoculado con *A. brasilense* (cepa DSM 1859) en formulación líquida, a una concentración de 1×10^8 UFC/ml, obtuvo los valores más altos en cuanto a la variable peso fresco de raíz con 6,29 g en condición de capacidad de campo, mientras que en estado de déficit hídrico la altura de planta fue de 24,6 cm y longitud específica radical 1259 cm/g,

superior al tratamiento testigo. Por el contrario, Sánchez (2020) al inocular esta bacteria sobre plantas de arroz bajo condiciones de invernadero, obtuvo un crecimiento que no se diferenció del tratamiento testigo, cuando utilizó un inoculante líquido con una concentración de $8,5 \times 10^{10}$ bacterias/ml; la misma autora encontró mayor longitud de raíz (31,4 cm), altura de planta (58,8 cm) y biomasa fresca y seca (11,8g y 1g) que el testigo sin inocular, al utilizar un inoculante sólido con una concentración de $2,8 \times 10^8$ UFC/ml.

Debido a que estos ensayos se realizaron con diferentes formulaciones y a que no se evaluaron dosis crecientes de la bacteria, se desconoce si el efecto se debe a la concentración de bacterias o a la formulación utilizada.

Con este trabajo se pretende determinar el efecto de la concentración y formulación de *A. brasilense* sobre variables de crecimiento de altura, longitud radical, relación raíz/tallo y pesos frescos y secos aéreos y de raíz de las plantas de arroz variedad Palmar 18.

4. METODOLOGÍA

4.1. Localización del trabajo

El ensayo experimental se llevó a cabo en el laboratorio e invernadero de Microbiología Agrícola del Centro de Investigaciones Agronómicas (CIA) (latitud 9. 939679 N; longitud 84. 045679; 1232 m.s.n.m.), ubicado en la Universidad de Costa Rica, San Pedro de Montes de Oca, San José.

4.2. Material Experimental

Se utilizó la cepa de *Azospirillum brasilense* código DSM1859, proporcionada por el Laboratorio de Microbiología Agrícola del CIA. Se emplearon semillas de arroz con 4 meses de cosecha de la variedad Palmar 18, donadas por el Centro de Investigación en Granos y Semillas (CIGRAS).

4.3. Ensayos y tratamientos

Se realizaron tres ensayos, cada uno consistió en el uso de una formulación inoculada diferente con *Azospirillum brasilense* código DSM1859, tres concentraciones diferentes de la bacteria 10^7 , 10^8 y 10^9 UFC y un testigo, en el que se utilizó el medio de cultivo sin la

bacteria. Las formulaciones utilizadas fueron: a) medio líquido de melaza, b) medio sólido de vermicompost y c) liofilizado suspendido en medio Dygs. En total cada ensayo contó con tres tratamientos (concentraciones de la bacteria) y un tratamiento testigo (Cuadro 1).

Cuadro 1. Ensayos, tratamientos y nomenclatura utilizada en la determinación del efecto de las tres formulaciones con concentraciones crecientes de *A. brasilense* sobre el crecimiento de plantas de arroz (*Oryza sativa* L.) variedad Palmar 18, a nivel de invernadero.

Ensayos	Descripción	Abreviatura
Ensayo 1		
Inoculante líquido		
Testigo medio melaza	Semillas de arroz inmersas en medio melaza sin inoculación de la bacteria.	TM0
Concentración 1	Semillas de arroz inmersas en medio melaza con <i>A. brasilense</i> a una concentración de 10^7 UFC/ml.	TM7
Concentración 2	Semillas de arroz inmersas en medio melaza con <i>A. brasilense</i> a una concentración de bacterias 10^8 UFC/ml.	TM8
Concentración 3	Semillas de arroz inmersas en medio melaza con <i>A. brasilense</i> a una concentración de bacterias 10^9 UFC/ml.	TM9
Ensayo 2		
Vermicompost		
Testigo Vermicompost	Semillas de arroz inmersas en solución de vermicompost, sin <i>A. brasilense</i> .	TV0
Concentración 1	Semillas de arroz inmersas en solución de vermicompost con <i>A. brasilense</i> a una concentración de 10^7 UFC/ml.	TV7
Concentración 2	Semillas de arroz inmersas en solución de vermicompost con <i>A. brasilense</i> a una concentración de 10^8 UFC/ml.	TV8
Concentración 3	Semillas de arroz inmersas en solución de vermicompost con <i>A. brasilense</i> a una concentración de 10^9 UFC/ml.	TV9

Ensayos	Descripción	Abreviatura
Ensayo 3		
Inoculante liofilizado	Semillas de arroz en una solución del medio liofilizado sin inocular con la bacteria.	TL0
Testigo liofilizado	medio	
Concentración 1	Semillas de arroz inmersas en medio <i>A. brasilense</i> liofilizado a una concentración de 10^7 UFC/ml.	TL7
Concentración 2	Semillas de arroz inmersas en <i>A. brasilense</i> liofilizado a una concentración de 10^8 UFC/ml.	TL8
Concentración 3	Semillas de arroz inmersas en <i>A. brasilense</i> liofilizado a una concentración de 10^9 UF/C ml.	TL9

4.4. Preparación de los inoculantes

La preparación de cada uno de los inoculantes en medio de melaza, vermicompost y liofilizado se realizó a partir de un cultivo inicial de *A. brasilense* a una concentración de 10^9 UFC/ml.

4.4.1. Inoculante medio de melaza

Para preparar el inóculo se cultivó la bacteria *A. brasilense* DSM1859 en un plato Petri con medio Ácido Máfico-Rojo Congo, RC, (anexo 5), el cual se incubó durante seis días a temperatura ambiente. Posteriormente, con un asa estéril se tomaron dos colonias de *A. brasilense* y se inocularon en 20 ml de caldo nutritivo (anexo 6). El cultivo se colocó en la incubadora durante tres días a 30 °C y 130 rpm. Con 5 ml de volumen del caldo nutritivo se inoculó 45 ml de medio de melaza (anexo 3), para una relación 1/10 inóculo: cultivo, se incubó bajo las mismas condiciones de temperatura y revoluciones por minuto durante tres días (Sánchez, 2020). Transcurrido este tiempo se determinó la concentración de la bacteria por recuento directo utilizando un hemocitómetro (marca Neubauer) y mediante diluciones seriadas 1:10 en tubos con medio de melaza estéril, se ajustó la concentración bacteriana a 10^7 y 10^8 bacterias/ml. Se realizaron recuentos en plato en medio de RC de cada concentración a los cuatro días de crecimiento.

4.4.2. Inoculante a base de vermicompost

Se preparó un inoculante sólido con vermicompost, proveniente del módulo lechero de la Universidad de Costa Rica Sede del Atlántico, para el cual se tomaron 45 g de este material y se empacó en una bolsa plástica. Seguidamente, el material se esterilizó tres veces en autoclave a una temperatura de 121 °C durante una hora, con un intervalo de 24 h entre cada esterilización (Sánchez, 2020). Se realizó una prueba de pureza tras la última esterilización, para esto se tomó una muestra de 0,5 g y se colocó en un tubo eppendorf con 1 ml de agua desionizada estéril. Se homogenizó la muestra con un agitador tipo vórtex y se inoculó con un aplicador estéril sobre un plato Petri con medio RC, el plato se incubó durante cuatro días a 25 °C.

Se preparó un cultivo bacteriano en una botella con 20 ml de caldo nutritivo, a partir de dos colonias de *A. brasilense* crecido en plato con medio RC durante tres días a temperatura ambiente. La botella se colocó en una incubadora a temperatura de 30 °C y 130 rpm durante tres días, se tomó 10 % del volumen del cultivo y se inoculó en una botella con 50 ml de medio de melaza, el cultivo se incubó durante tres días bajo las mismas condiciones. Se determinó por recuento directo y en plato la concentración de *Azospirillum*. De acuerdo con el resultado encontrado en el recuento directo, se ajustó la concentración bacteriana a 10^7 y 10^8 UFC/ml en la forma previamente descrita.

Para inocular el vermicompost, se pesaron y colocaron 5 g de vermicompost estéril en cuatro tubos cónicos de 15 ml, a cada uno de ellos se le agregó 1 ml del inóculo a la correspondiente concentración bacteriana, excepto el tratamiento testigo al que se le agregó 1 ml del medio de melaza sin la bacteria, los tubos se incubaron a temperatura ambiente durante 11 días. Posterior a este tiempo, se realizó un recuento en plato en medio RC de cada uno de los tratamientos de vermicompost.

4.4.3. Inoculante liofilizado de *A. brasilense*

Se preparó un cultivo de la bacteria en el medio de melaza bajo las siguientes condiciones: 30 °C y 150 rpm durante tres días. El cultivo se congeló a -70°C y se liofilizó con una presión de 0,040 mBar a una temperatura de -50°C durante cinco días. Se liofilizó además medio de cultivo sin inocular con la bacteria, para utilizarlo como testigo.

Para preparar la suspensión bacteriana se pesaron 0,5 g del liofilizado, se vertieron en 50 ml de medio de cultivo Dygs y se colocaron en la incubadora durante tres días a 30 °C y 150 rpm. Posteriormente, se realizó un recuento directo en hemocitómetro, a partir de esta concentración se realizaron diluciones seriadas 1:10 en medio Dygs estéril, para ajustar la concentración a 10^7 y 10^8 bacterias/ml, para inocular las semillas. A cada tratamiento se le realizó un recuento en plato en medio de RC.

4.4.4. Inoculación de arroz con *A. brasilense*.

La inoculación del arroz variedad Palmar 18 con la bacteria *A. brasilense*, se realizó embebiendo las semillas con las diferentes formulaciones de inoculante durante 48 horas (Aguirre, 2018). Para este procedimiento se empleó tubos cónicos de 15 ml para el inoculante de melaza y liofilizado, para el inoculante de vermicompost se utilizó recipientes plásticos de 50ml, de tal forma que las semillas quedaron cubiertas por completo con las formulaciones.

En el caso de la formulación medio de melaza, se inocularon 60 semillas de arroz en 5 ml de este medio a tres concentraciones: 10^7 , 10^8 y 10^9 UFC/ml, en el caso de los testigos las semillas se embebieron en 5 ml del medio melaza sin inóculo. En lo que respecta a la formulación a base de vermicompost, las 60 semillas se sumergieron en una solución de 5 ml de agua estéril y 1g de vermicompost con el inóculo a la concentración correspondiente. Al testigo se le adicionó una solución de 5 ml de agua estéril y 1 g de vermicompost sin inóculo.

Para el inoculante liofilizado, se sumergieron 60 semillas en suspensiones de 5 ml de 10^7 , 10^8 y 10^9 UFC/ml, preparadas con el inoculante liofilizado y en el medio liofilizado sin inocular.

4.4.5. Recuento en plato de cada una de las formulaciones

Se realizó un recuento en plato de cada uno de los tratamientos, para esto se efectuaron diluciones seriadas 1:10 con agua peptonada estéril desde 10^{-1} hasta 10^{-8} , de acuerdo con la concentración de bacteria. Se cultivaron por duplicado las diluciones más diluidas de cada uno de los tratamientos (10^{-6} , 10^{-7} y 10^{-8}), para esto se sembró 0,1 ml en una placa Petri con medio RC. Todos los platos se incubaron durante cuatro días a temperatura ambiente.

En el caso del tratamiento de vermicompost, se tomó 1 g del vermicompost y se diluyó en 9 ml de agua peptonada, a partir del cual se realizaron las diluciones seriadas. Transcurrido el tiempo de incubación se determinó la presencia de *A. brasilense* en la superficie del medio RC, mediante el conteo de UFC; el resultado se transformó en UFC/g o UFC/ml mediante la siguiente fórmula:

$$\text{UFC/g} = \text{número de colonias por placa} \times \text{FD}$$

FD=1/10 de la dilución realizada.

4.4.6. Siembra del ensayo

En el invernadero del Centro de Investigaciones Agronómicas, de la Universidad de Costa Rica, sede Rodrigo Facio, se sembraron los ensayos en potes de 2 l, sobre suelo del orden vertisol proveniente de un lote cultivado con arroz, originario de Hacienda Mojica, ubicada en el cantón de Bagaces de la provincia de Guanacaste (Anexo 1). Previo a la siembra, se verificó el porcentaje de germinación de las semillas, el cual fue de un 86 %.

En cada pote se sembraron 15 semillas, de acuerdo con su tratamiento y repetición, se realizó un raleo 15 días después de la siembra y se dejaron solamente las plantas que germinaron al mismo tiempo, hasta obtener cinco plantas por pote. Para mantener las plantas hidratadas, en cada uno de los potes se colocó un recipiente en la base, al que se le suministró agua cada cuatro días. Se registró la temperatura y humedad diurna dentro del invernadero con Hobo Data Logger UX100 series.

Para evaluar el efecto del inoculante, a cada una de las plantas que conformaron cada tratamiento se le analizaron siete variables relacionadas con el crecimiento y desarrollo vegetal: altura de la planta a través del tiempo, longitud de raíz, relación raíz/tallo, peso fresco y seco de la parte aérea y radicular de las plantas de manera individual. Las evaluaciones de todos los ensayos se llevaron a cabo a los 90 días después de la siembra, excepto la variable de altura que se midió en tres ocasiones, a los 30, 60 y 90 días después de la siembra (Brasil et al., 2021).

- **Altura de la planta:** se midió la altura de la planta en centímetros, desde la base de la raíz hasta la yema terminal más prominente.

- Longitud de raíz: se midió en centímetros, a partir del cuello de la raíz hasta la raíz secundaria más desarrollada.
- Peso fresco de la parte aérea y radicular: se extrajo la planta del suelo y se limpiaron las raíces con abundante agua, se separaron la parte aérea y radicular para determinar el peso en fresco de ambas partes por separado, mediante una balanza analítica.
- Peso seco de parte aérea y la raíz: las muestras de la parte aérea y raíz se depositaron en bolsas de papel y se colocaron en una estufa a 80 °C por 48 horas. Después del tiempo de secado las muestras se pesaron en balanza analítica.
- Relación raíz/tallo: se estableció la relación entre el peso seco de la raíz dividido entre el peso seco de la parte aérea de las plantas.

4.5. Diseño experimental

Se realizaron tres ensayos en los que se evaluaron tres formulaciones (medio melaza, vermicompost y liofilizado) y en cada ensayo tres concentraciones de la bacteria (10^7 , 10^8 y 10^9 UFC). Se utilizaron cuatro repeticiones (potes) por tratamiento, cada uno con cinco plantas, las cuales corresponden a la unidad experimental.

4.6. Análisis estadístico de los datos

Se utilizó un diseño completamente al azar. A los resultados se le realizó un análisis de varianza ANDEVA (previa verificación de los supuestos de esta prueba), la prueba de comparación de medias LSD ($P < 0,05$) y prueba de contrastes entre los tratamientos, para ello se empleó el paquete estadístico Infostat 2020.

4.7. Condiciones de temperatura y humedad relativa del ensayo.

El ensayo se desarrolló en los meses de febrero a mayo del año 2022, durante un periodo de 90 días bajo condiciones de invernadero, en los cuales las temperaturas máximas alcanzadas oscilaron entre los 30 y 34 °C con una humedad relativa entre 87 y 90 %, mientras que, las temperaturas bajas fluctuaron entre 15 y 19 °C, con una humedad relativa entre 36 y 46 % (Figura 1).

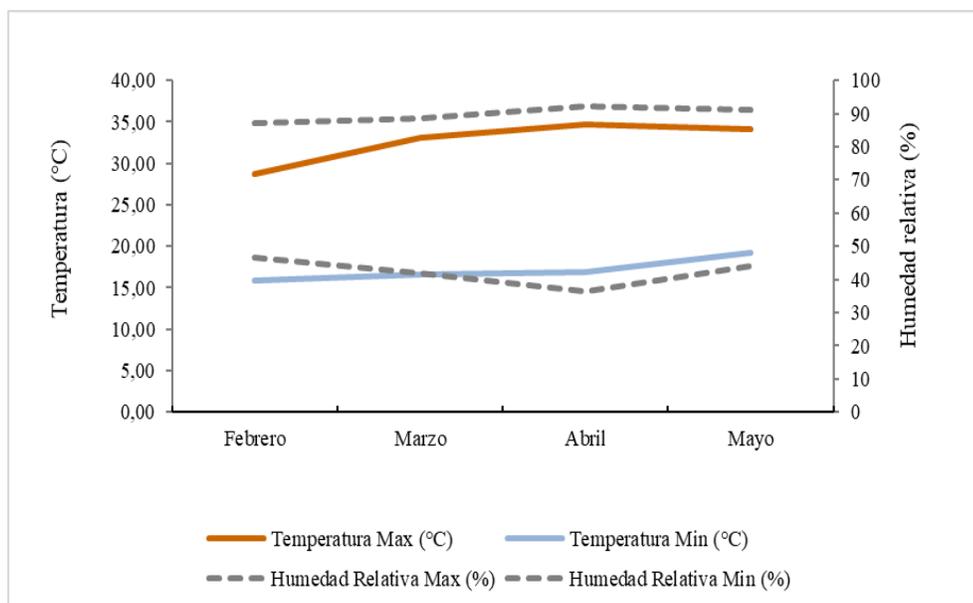


Figura 1. Temperatura y humedad relativa máxima y mínima durante el periodo de desarrollo del ensayo en el invernadero del Centro de Investigaciones Agronómicas.

5. RESULTADOS

5.1. Preparación de los inoculantes

El medio de cultivo madre utilizado para la preparación de las diferentes formulaciones del medio melaza presentó, al utilizar la técnica de recuento directo, una población de $5,0 \times 10^9$ bacterias/ml. Los inoculantes TM7, TM8 y TM9, preparados a partir de este cultivo, obtuvieron las concentraciones de *Azospirillum* esperadas (Cuadro 2). El cultivo en medio Dygs empleado para la preparación de las formulaciones hechas a partir del inoculante liofilizado, presentó por recuento directo una concentración de $1,0 \times 10^9$ bacterias/ml a los tres días de crecimiento. A partir de este cultivo se logró obtener las concentraciones esperadas de *A. brasilense* en los tratamientos TL7, TL8 y TL9 (Cuadro 2).

Cuadro 2. Concentración de los inoculantes líquidos y liofilizados a los cuatro días de crecimiento, mediante plateo en el medio Ácido Máfico Rojo Congo.

Tratamiento	<i>Azospirillum brasilense</i> UFC/ml
Inoculante líquido melaza	
TM7	3,7 x10 ⁷
TM8	3,1 x10 ⁸
TM9	3,0 x10 ⁹
Inoculante liofilizado	
TL7	6,0 x10 ⁷
TL8	5,1 x10 ⁸
TL9	3,5 x10 ⁹

El cultivo en medio de melaza empleado para la inoculación de las formulaciones de vermicompost presentó una concentración de $1,9 \times 10^9$ bacterias/ml determinado mediante recuento directo, a partir del cual se preparó las concentraciones de 10^7 y 10^8 UFC/ml para inocular los otros tratamientos. Sin embargo, posteriormente a los 11 días de la inoculación del vermicompost con su respectivo tratamiento, no fue posible contabilizar el número de *A. brasilense* en las tres formulaciones (anexo 2).

5.2. Inoculación de arroz con *A. brasilense*.

5.2.1. Ensayo 1: inoculante líquido de melaza.

Cuando se utilizó el inoculante líquido de melaza no se observó diferencias significativas en la altura de las plantas entre las diferentes concentraciones de la bacteria y el testigo. Sin embargo, en las distintas fechas de muestreo a los 30, 60 y 90 días después de

la siembra, las plantas si presentaron crecimiento en todos los tratamientos (Figura 2). Para la variable longitud de raíz no se encontró diferencia al inocular la bacteria con respecto al testigo, pero si existió diferencia entre la concentración menor y mayor de bacteria, dado que el tratamiento de 10^7 UFC/ml presentó una longitud mayor de raíz (8cm) con respecto al tratamiento de 10^9 UFC/ml (Figura 3).

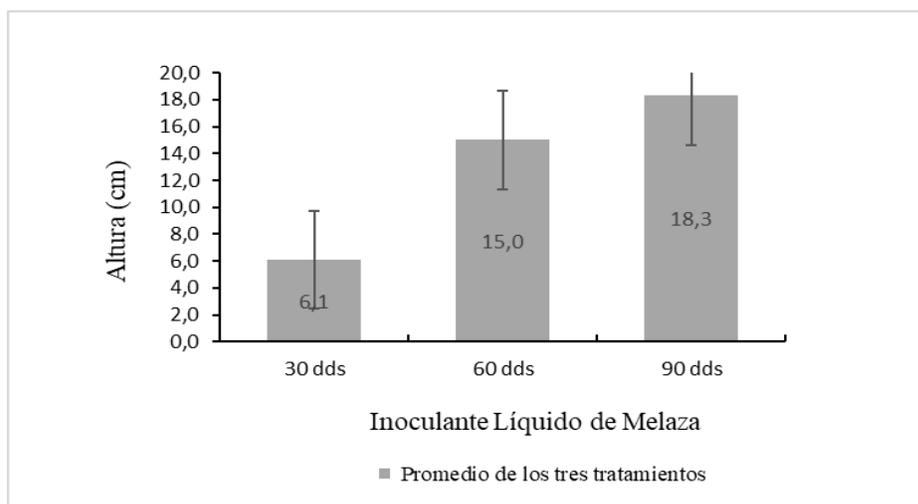


Figura 2. Efecto de la concentración de *Azospirillum* en el inoculante líquido de melaza sobre la altura de las plantas de arroz de la variedad Palmar 18 bajo condiciones de invernadero, en los distintos momentos de medición a los 30, 60 y 90 días después de la siembra. Las barras representan el error estándar.

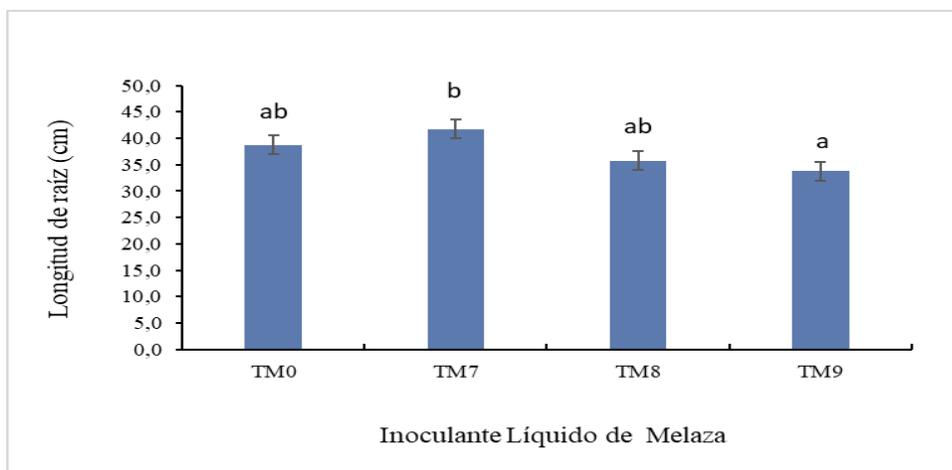


Figura 3. Efecto de la concentración de *Azospirillum* en el inoculante líquido de melaza sobre la longitud de raíz de las plantas de arroz de la variedad Palmar 18 bajo condiciones de

invernadero. La numeración 7, 8 y 9 corresponden a las concentraciones 10^7 , 10^8 y 10^9 UFC/ml respectivamente. Letras diferentes significan tratamientos estadísticamente distintos según la prueba de LSD ($p < 0,05$). Las barras representan el error estándar.

En la medición de la variable del peso fresco de la parte aérea (Figura 4) se observó una respuesta en las plantas de arroz a la inoculación de la bacteria, mostrando pesos frescos superiores de hasta 1,6 g con respecto al tratamiento testigo. La prueba de estadística de contrastes evidencia este hecho, donde el tratamiento testigo con respecto a los tratamientos inoculados con la bacteria (p-valor de 0,0006) son estadísticamente distintos ($p < 0,05$). Por otro lado, la mayor concentración utilizada de inóculo (10^9) no se diferenció de las concentraciones de los tratamientos TM7 (10^7) y TM8 (10^8).

En esta misma figura podemos observar la variable peso seco de la parte aérea de las plantas, en donde la concentración de la bacteria en esta formulación no evidenció diferencias significativas con respecto al tratamiento testigo. Sin embargo, entre las concentraciones de bacteria los tratamientos TM8 y TM9, mostraron un peso seco inferior de 0,19 g en comparación al tratamiento TM7.

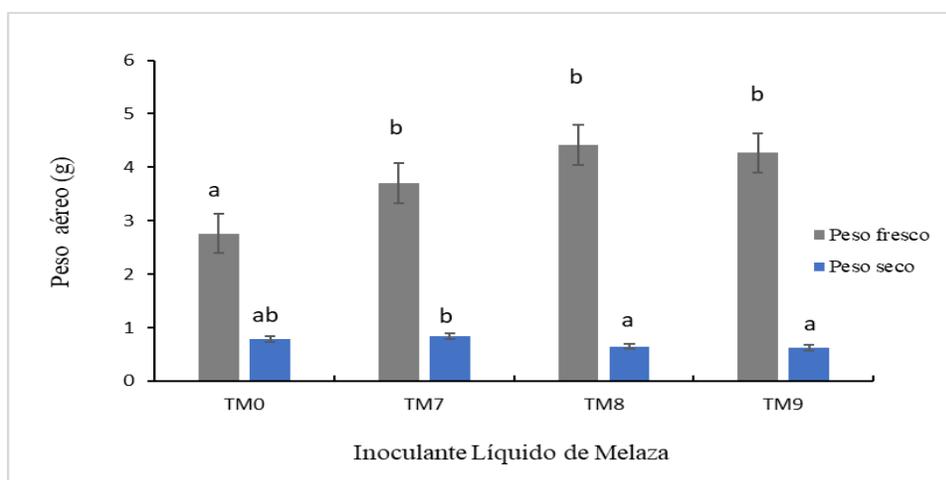


Figura 4. Efecto de la concentración de *Azospirillum* en el inoculante líquido de melaza sobre el peso fresco y seco de la parte aérea de las plantas de arroz de la variedad Palmar 18 bajo condiciones de invernadero. La numeración 7, 8 y 9 corresponden a las concentraciones 10^7 , 10^8 y 10^9 UFC/ml respectivamente. Letras diferentes significan tratamientos estadísticamente distintos según la prueba de LSD ($p < 0,05$). Las barras representan el error estándar.

En lo que respecta a la variable del peso fresco de la raíz (Figura 5), se encontró que los tratamientos inoculados fueron estadísticamente distintos al testigo (p-valor de 0,0001). En esta variable destacan las dosis de 10^8 y 10^9 UFC/ml con pesos mayores de 2,5 g en relación al testigo y un peso menor de 1,5 g con respecto a la concentración menor de 10^7 UFC/ml (TM7). Los resultados no mostraron diferencias entre tratamientos para la variable peso seco de raíz.

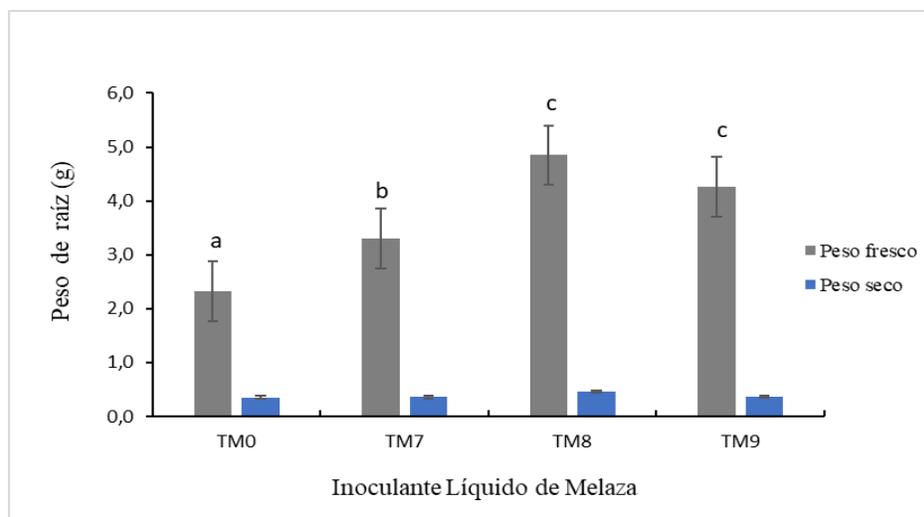


Figura 5. Efecto de la concentración de *Azospirillum* en el inoculante líquido de melaza sobre el peso fresco y seco de la raíz de las plantas de arroz de la variedad Palmar 18 bajo condiciones de invernadero. La numeración 7, 8 y 9 corresponden a las concentraciones 10^7 , 10^8 y 10^9 UFC/ml respectivamente. Letras diferentes significan tratamientos estadísticamente distintos según la prueba de LSD ($p < 0,05$). Las barras representan el error estándar.

Al valorar el efecto de la concentración de bacteria en el inóculo de melaza sobre la relación raíz/tallo de las plantas (Figura 6), los datos muestran una diferencia significativa en la concentración 10^8 UFC/ml con respecto al tratamiento testigo y la concentración de 10^7 UFC/ml, el cual fue superior a 0,72. Esta misma formulación no presentó diferencia con el tratamiento TM9.

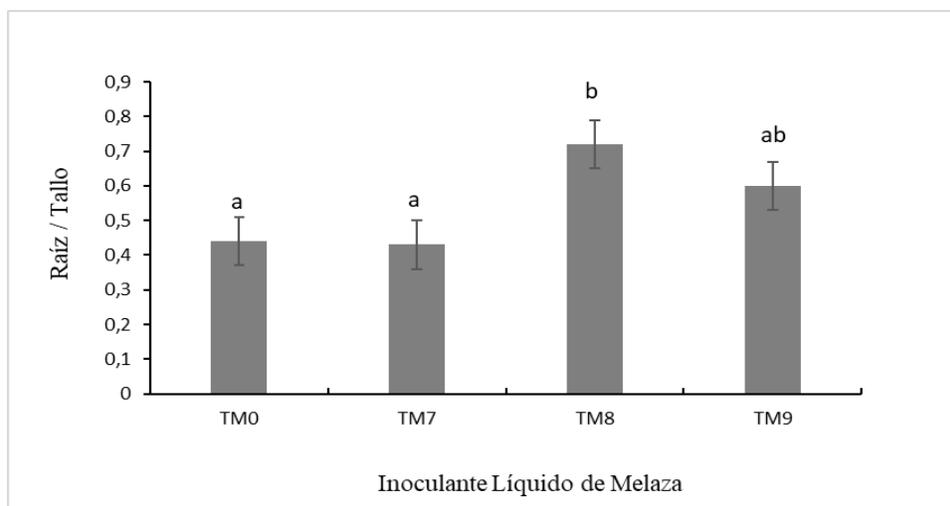


Figura 6. Efecto de la concentración de *Azospirillum* en el inoculante líquido de melaza sobre la relación raíz/tallo de las plantas de arroz de la variedad Palmar 18 bajo condiciones de invernadero. La numeración 7, 8 y 9 corresponden a las concentraciones 10^7 , 10^8 y 10^9 UFC/ml respectivamente. Letras diferentes significan tratamientos estadísticamente distintos según la prueba de LSD ($p < 0,05$). Las barras representan el error estándar.

5.2.2. Ensayo 2: inoculante vermicompost

Los resultados de la inoculación de la formulación con vermicompost, en la variable altura los datos no mostraron diferencias significativas con respecto al tratamiento testigo, sin embargo, en las distintas fechas de muestreo a los 30, 60 y 90 días después de la siembra, las plantas si presentaron crecimiento en todos los tratamientos (Figura 7). En el caso de la medición de la longitud de raíz tampoco hubo diferencia entre los tratamientos (Figura 8).

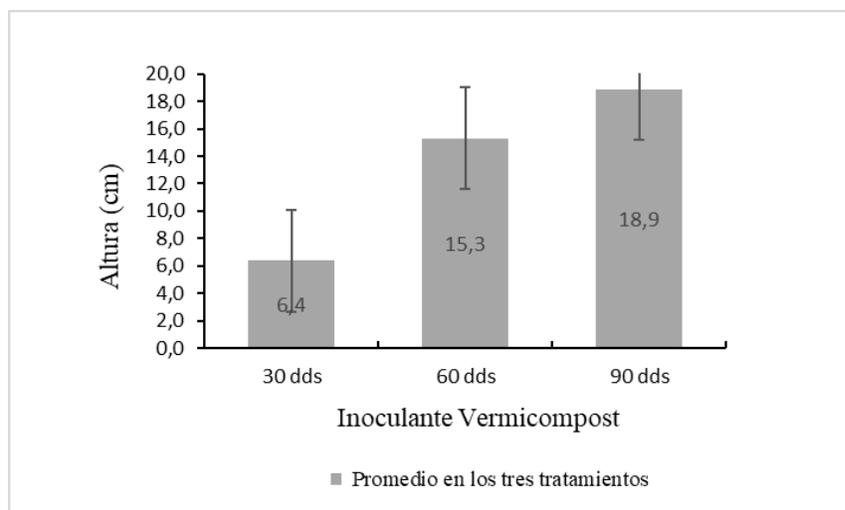


Figura 7. Efecto de la concentración de *Azospirillum* en el inoculante de vermicompost sobre la altura de las plantas de arroz de la variedad Palmar 18 bajo condiciones de invernadero, en los distintos momentos de medición a los 30, 60 y 90 días después de la siembra. Las barras representan el error estándar.

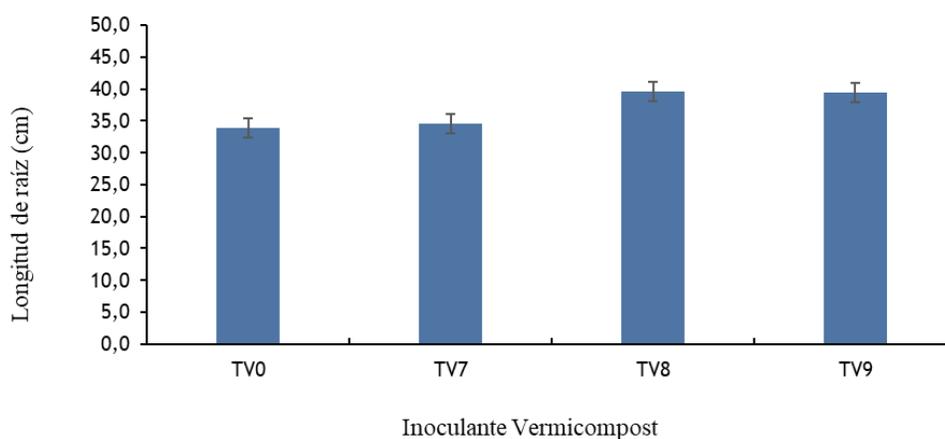


Figura 8. Efecto de la concentración de *Azospirillum* en el inoculante de vermicompost sobre la longitud de raíz de las plantas de arroz de la variedad Palmar 18 bajo condiciones de invernadero. La numeración 7, 8 y 9 corresponden a las concentraciones 10^7 , 10^8 y 10^9 UFC/g respectivamente. Las barras representan el error estándar.

En la variable de peso fresco aéreo, los tratamientos no reflejaron diferencias significativas con respecto al tratamiento testigo (Figura 9), sin embargo, el tratamiento a una concentración de 10^8 UFC/g presentó 1,5 g menos que en el tratamiento inoculado a una concentración de 10^7 UFC/g. En cuanto al efecto de este inoculante sobre la variable de peso seco aéreo, no se evidenció ninguna diferencia significativa con respecto al tratamiento testigo (Figura 9).

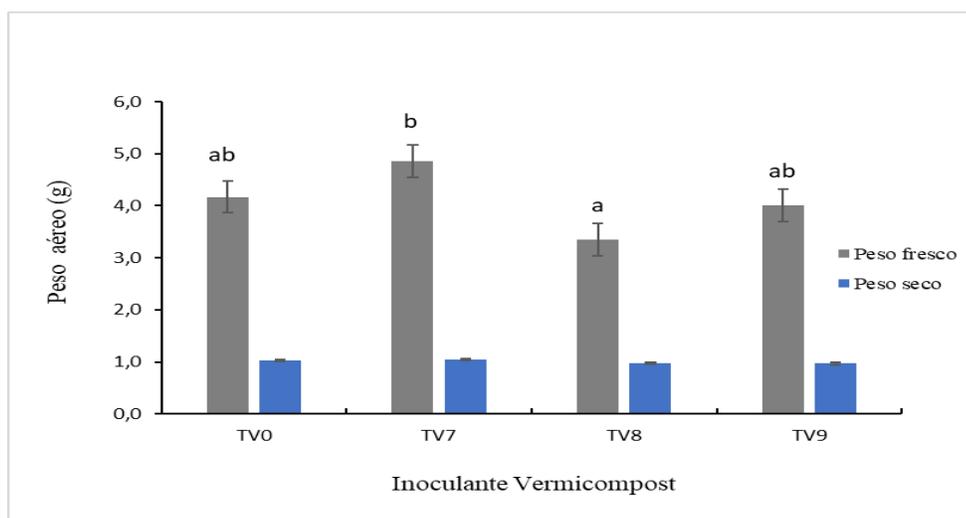


Figura 9. Efecto de la concentración de *Azospirillum* en el inoculante de vermicompost sobre el peso fresco y seco aéreo de las plantas de arroz de la variedad Palmar 18 bajo condiciones de invernadero. La numeración 7, 8 y 9 corresponden a las concentraciones 10^7 , 10^8 y 10^9 UFC/g respectivamente. Letras diferentes significan tratamientos estadísticamente distintos según la prueba de LSD ($p < 0,05$). Las barras representan el error estándar.

No se observaron diferencias significativas en el peso fresco, peso seco de la raíz (Figura 10) y la relación raíz/tallo (Figura 11) entre tratamientos.

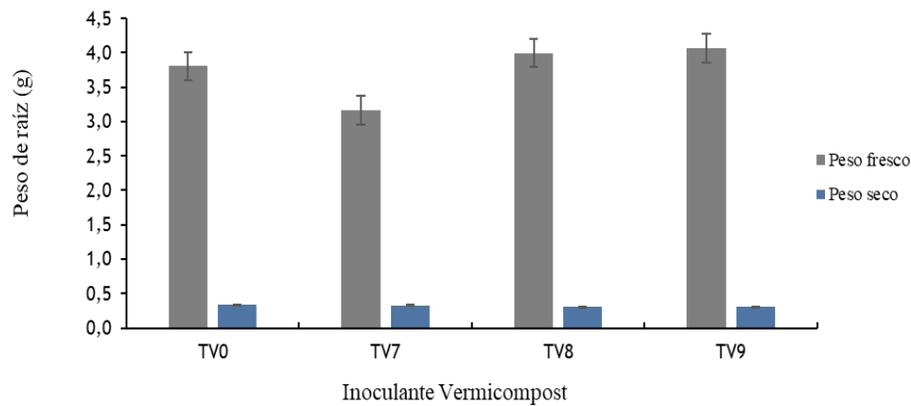


Figura 10. Efecto de la concentración de *Azospirillum* en el inoculante de vermicompost sobre el peso fresco y seco de raíz de las plantas de arroz de la variedad Palmar 18 bajo condiciones de invernadero. La numeración 7, 8 y 9 corresponden a las concentraciones 10^7 , 10^8 y 10^9 UFC/g respectivamente. Las barras representan el error estándar.

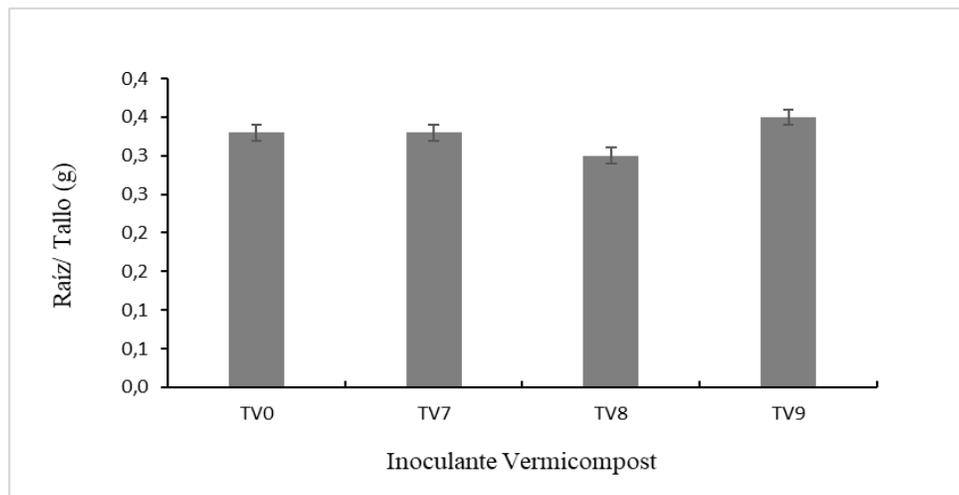


Figura 11. Efecto de la concentración de *Azospirillum* en el inoculante de vermicompost sobre la relación raíz/tallo de las plantas de arroz de la variedad Palmar 18 bajo condiciones de invernadero. La numeración 7, 8 y 9 corresponden a las concentraciones 10^7 , 10^8 y 10^9 UFC/g respectivamente. Las barras representan el error estándar.

5.2.3. Ensayo 3: inoculante liofilizado

Las plantas sometidas a la formulación liofilizada en la variable de altura no mostraron diferencias significativas entre tratamientos y el testigo, sin embargo, en las distintas fechas de muestreo a los 30, 60 y 90 días después de la siembra las plantas si presentaron un crecimiento en todos los tratamientos (Figura 12).

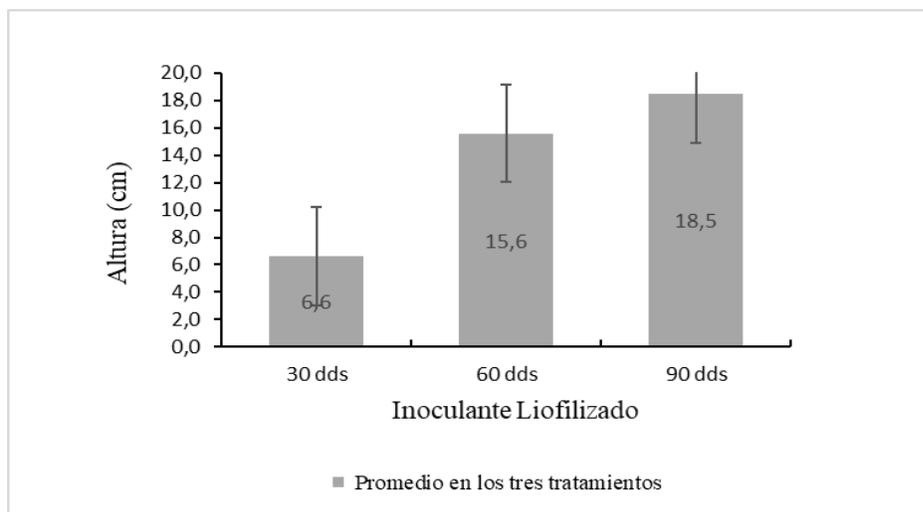


Figura 12. Efecto de la concentración de *Azospirillum* en el inoculante liofilizado sobre la altura de las plantas de arroz de la variedad Palmar 18 bajo condiciones de invernadero, en los distintos momentos de medición a los 30, 60 y 90 días después de la siembra. Las barras representan el error estándar.

En cuanto a la medición del efecto del inoculante sobre la longitud de raíz (Figura 13), no se evidenció diferencias significativas de las concentraciones de la bacteria con respecto al tratamiento testigo, sin embargo, el tratamiento TL8 presentó una longitud de raíz 7,4 cm inferior al tratamiento TL9.

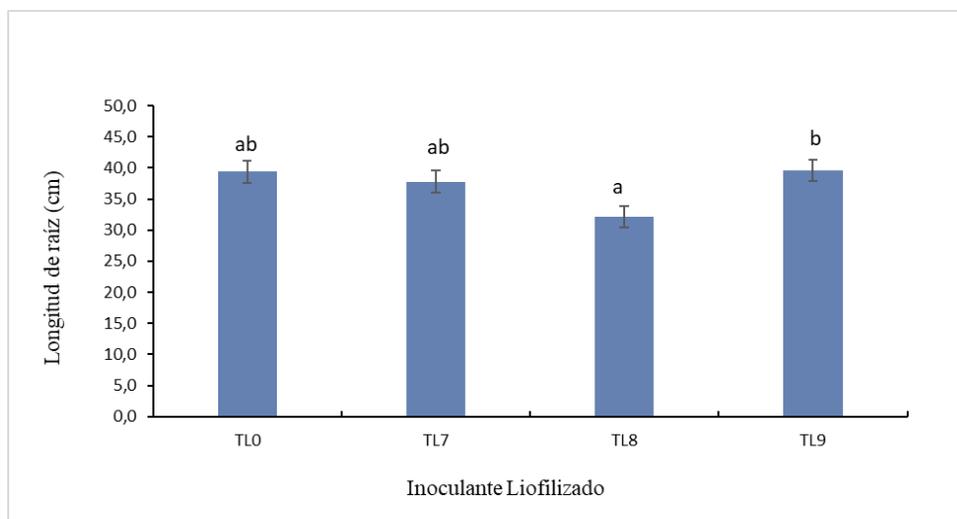


Figura 13. Efecto de la concentración de *Azospirillum* en el inoculante liofilizado sobre la longitud de raíz de las plantas de arroz de la variedad Palmar 18 bajo condiciones de invernadero. La numeración 7, 8 y 9 corresponden a las concentraciones 10^7 , 10^8 y 10^9 UFC/ml respectivamente. Letras diferentes significan tratamientos estadísticamente distintos según la prueba de LSD ($p < 0,05$). Las barras representan el error estándar.

En la medición del peso fresco y seco aéreo de las plantas, en los resultados no se evidenció diferencias significativas entre las concentraciones del inoculante con respecto al tratamiento testigo (Figura 14), este mismo resultado se observó al evaluar el peso fresco y seco de la raíz (Figura 15). Sin embargo, la concentración a 10^9 UFC/ml mostró un peso fresco aéreo y de raíz de 0,85 g y 2 g respectivamente inferior a las otras formulaciones de 10^7 y 10^8 UFC/ml.

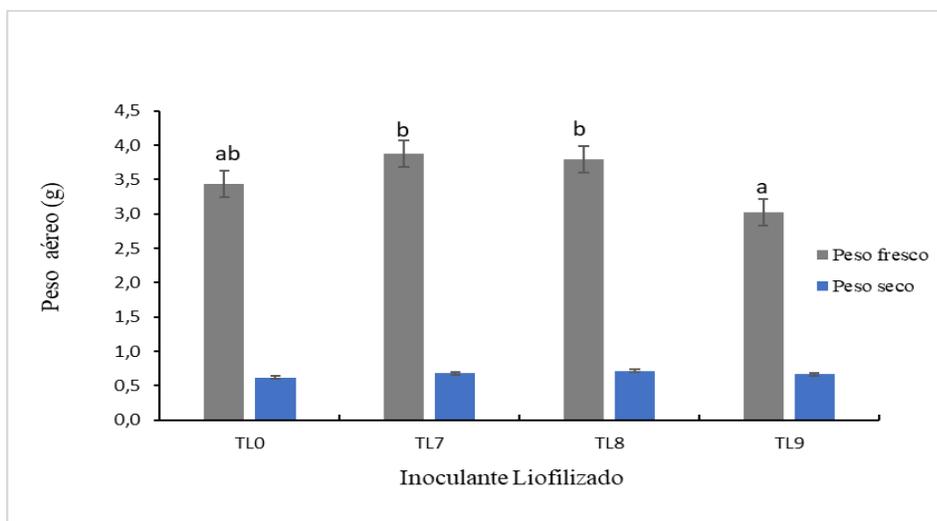


Figura 14. Efecto de la concentración de *Azospirillum* en el inoculante liofilizado sobre el peso fresco y seco aéreo de las plantas de arroz de la variedad Palmar 18 bajo condiciones de invernadero. La numeración 7, 8 y 9 corresponden a las concentraciones 10^7 , 10^8 y 10^9 UFC/ml respectivamente. Letras diferentes significan tratamientos estadísticamente distintos según la prueba de LSD ($p < 0,05$). Las barras representan el error estándar.

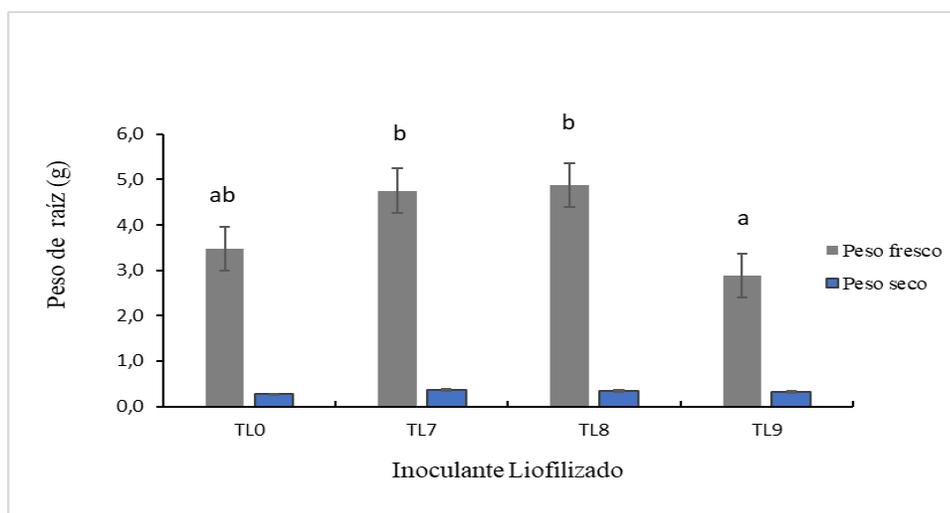


Figura 15. Efecto de la concentración de *Azospirillum* en el inoculante liofilizado sobre el peso fresco y seco de raíz de las plantas de arroz de la variedad Palmar 18 bajo condiciones de invernadero. La numeración 7, 8 y 9 corresponden a las concentraciones 10^7 , 10^8 y 10^9 UFC/ml respectivamente. Letras diferentes significan tratamientos estadísticamente distintos según la prueba de LSD ($p < 0,05$). Las barras representan el error estándar.

Al estimar la relación raíz/tallo de las plantas bajo esta formulación, los datos no mostraron diferencia significativa entre las diferentes concentraciones de bacteria, con respecto al tratamiento testigo (Figura 16).

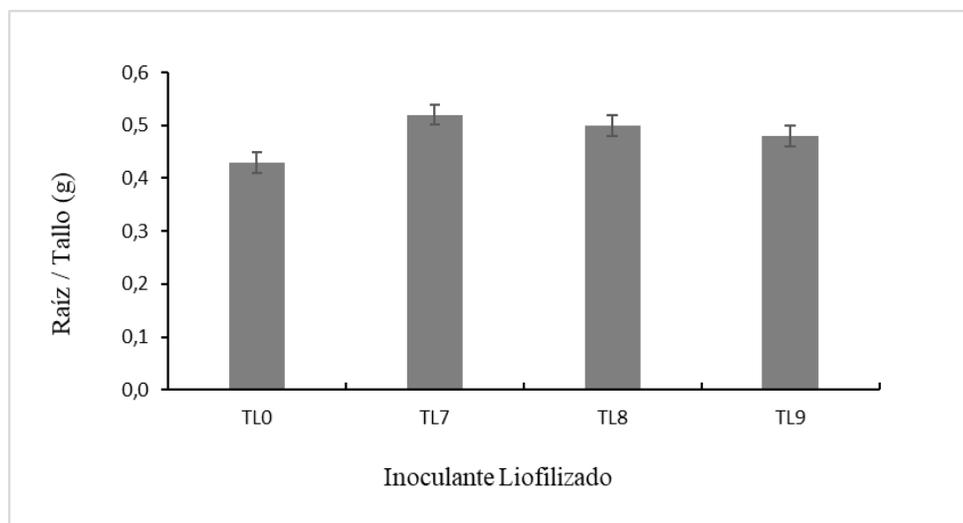


Figura 16. Efecto de la concentración de *Azospirillum* en el inoculante liofilizado sobre la relación raíz/tallo de las plantas de arroz de la variedad Palmar 18 bajo condiciones de invernadero. La numeración 7, 8 y 9 corresponden a las concentraciones 10^7 , 10^8 y 10^9 UFC/ml respectivamente. Las barras representan el error estándar.

6. DISCUSIÓN

6.1. Formulación de los inoculantes

En la preparación de los inoculantes se logró llegar a la concentración deseada de *A. brasilense* para las formulaciones líquida y liofilizada, mientras que, en el caso del inóculo a base de vermicompost, a pesar de que se autoclavó tres veces, posteriormente a los 11 días de la inoculación del vermicompost con su respectivo tratamiento, no fue posible contabilizar el número de *A. brasilense* en las tres formulaciones, debido a la presencia de otros microorganismos como bacterias y actinomicetes (anexo 2), sin embargo, se logró demostrar la presencia de la bacteria en las semillas que fueron expuestas a los inoculantes, mediante la colocación de las mismas en plato con medio RC durante cuatro días, en el que se comprobó el crecimiento de *Azospirillum*, pero no así su concentración.

Este resultado concuerda con lo encontrado por Sánchez (2020), donde la formulación de vermicompost inoculado con *A. brasilense* presentó un porcentaje de hasta un 65 % de otras bacterias, al igual que el vermicompost no inoculado. Esto se pudo deber a que el vermicompost es un material que contiene altas poblaciones de microorganismos, generalmente mayores a 1×10^8 UFC, por lo que logran prevalecer en el medio (Artavia et al., 2010., Durán et al., 2007).

Cuando el vermicompost se autoclava, como en el presente estudio, los microorganismos presentes en el abono pueden estar protegidos por la materia orgánica, de ahí que no toda la población microbiana es eliminada. Además, bacterias como *Bacillus*., contienen esporas de resistencia que les permite subsistir en condiciones adversas y germinar bajo condiciones adecuadas (Pedraza et al., 2020). Aunado a esto, al adicionar un medio rico en azúcares como la melaza al vermicompost autoclavado, se favorece el crecimiento de los microorganismos que lograron sobrevivir al proceso de esterilización (Sánchez 2020).

6.2. Efecto de la inoculación de *A. brasilense* en arroz a los 90 días.

6.2.1. Inoculante líquido a base de melaza

Los tratamientos inoculados con la bacteria a una concentración de 10^8 y 10^9 UFC/ml tendieron a presentar un incremento en el peso fresco aéreo y de raíz, al igual que la relación raíz/tallo con respecto al tratamiento de menor concentración 10^7 UFC/ml y a las plantas no inoculadas. Al respecto Kannan & Ponmurungan (2010), encontraron que al inocular *A. brasilense* en diferentes variedades de arroz, se obtuvo un aumento entre 25 a 30 g de peso fresco de raíces y brotes en relación con el testigo. Por otra parte, Aguirre (2018) en una investigación sobre la inoculación de varias bacterias promotoras de crecimiento vegetal, entre las que se encontraba *A. brasilense* cepa DSM 1859 a una concentración de 10^8 UFC/ml, al ser inoculadas en plantas de arroz, logró promover un incremento en el peso fresco de la raíz, en comparación al testigo. Cabe destacar que Aguirre hizo varias inoculaciones durante el crecimiento del cultivo, mientras que, en este trabajo únicamente se realizó la inoculación a la semilla.

El efecto positivo de la inoculación con *Azospirillum* sobre el peso fresco aéreo y radical de las plantas, se debe posiblemente a que la inoculación de *A. brasilense* permite

cambios fisiológicos y morfológicos en las raíces, además de que estimula la producción de fitohormonas en la planta como el ácido indolacético (IAA), citoquininas, giberelinas, ácido abscísico y etileno, lo que fomenta el crecimiento radical que permite un incremento en la absorción de agua y minerales, así como una mayor tolerancia a la salinidad y sequía, ya que aumenta la conductancia estomática en las hojas (Puente et al., 2013; Saranraj et al., 2022). Además, a que *Azospirillum* utiliza una variedad de fuentes de carbono como energía para su crecimiento, principalmente la fructosa y la glucosa, aunque se reportan otras moléculas más afines como ácidos grasos, malato y succinato (Días et al., 2013). El medio líquido de melaza utilizado para el crecimiento de las bacterias en el ensayo 1 (anexo 3), proporcionó una fuente importante de carbono (sacarosa y glucosa), componentes nitrogenados para la síntesis de biomasa microbiana (aminoácidos y amonio), minerales necesarios para la activación de enzimas, respiración celular (sodio, azufre, fósforo, calcio, magnesio, potasio, hierro) y vitaminas (tiamina, riboflavina, piridoxina y niacinamida) para el crecimiento celular (Contreras et al., 2011; Cárdenas et al., 2019), elementos que posiblemente al mismo tiempo favorecieron el crecimiento de la bacteria en el medio de inóculo y de las plantas.

El tratamiento TM8 no se diferenció estadísticamente en las diferentes variables estudiadas del tratamiento (TM9), lo que indica que un incremento en la concentración de la bacteria no generó un aumento en la biomasa de la planta, adicionalmente representa un costo menor el uso de dosis más bajas.

En esta investigación en la variable relación raíz/tallo en las concentraciones de 10^8 y 10^9 UFC/ml, se evidenció un aumento en la relación de biomasa en las raíces y la parte aérea, las primeras etapas de desarrollo de las plantas de arroz invierten gran cantidad de biomasa en el desarrollo del sistema radicular para su establecimiento, por lo que, al inocular la bacteria a estas concentraciones favoreció esta relación hacia el desarrollo radical (Chavarría, 2011). Como se mencionó anteriormente, la inoculación de *Azospirillum* puede cambiar la morfología de la raíz, aumenta el número de raíces laterales y mejora la formación de pelos radiculares para proporcionar más área de superficie radicular para absorber suficientes nutrientes y agua, lo que permite el avance del crecimiento y desarrollo de la planta (Bhardwaj et al., 2014).

El tratamiento TM9 no se diferenci6 del testigo en la relaci6n raíz/tallo, algunos autores indican que la aplicaci6n del in6culo a concentraciones superiores a 10^8 UFC puede presentar un efecto inhibitorio sobre el desarrollo vegetal (Bashan & Levanony, 1990; Dobbelaere et al., 2002; Sánchez, 2020), por lo que pudo reprimir el efecto de la bacteria sobre las plantas, obteniendo resultados similares al tratamiento testigo sin inoculaci6n de la bacteria.

Es importante mencionar que en este estudio no se aplic6 ning6n tipo de fertilizante, por lo que las plantas al mejorar su sistema radical en los tratamientos inoculados con la bacteria pudieron absorber mayor cantidad de agua, pero no así de nutrientes. El análisis de suelo (anexo1) evidencia un buen estado nutricional, al ser un vertisol presenta una mayor proporci6n de arcillas tipo 2:1 que muestra gran capacidad de retenci6n de cationes en sus superficies externas e internas, especialmente el potasio (K) y el amonio (NH_4), al igual que el f6sforo (P) que disminuye su solubilidad al ligarse al calcio (Henríquez et al., 2011), lo que pudo ser una limitante en el incremento de biomasa de las plantas, dado que las variables de peso seco aéreo y de raíz no fueron significativamente distintos al tratamiento testigo.

6.2.2. Inoculante vermicompost

El vermicompost al utilizarse como inoculante, se considera un agente que potencializa la producci6n de sustancias promotoras del crecimiento vegetal por los microorganismos presentes en él, como los actinomicetes, entre los que se encuentran bacterias capaces de fijar f6sforo y fomentar la producci6n de hormonas de crecimiento vegetal, además de que el vermicompost aporta nutrientes, azúcares y otras sustancias que favorecen el desarrollo de las plantas (Domínguez et al., 2010; Bouizgarne, 2013). *Azospirillum brasilense* posee un metabolismo de carbono y nitr6geno flexible que aumenta su capacidad de competir por la colonizaci6n de la rizosfera, sin embargo, se ha demostrado que algunos microorganismos del suelo como los actinomicetes y hongos pueden ejercer efectos antag6nicos sobre *Azospirillum*, por lo que, para una eficiente colonizaci6n, aparte del número de células viables de la bacteria utilizada, se espera que tenga una sobrevivencia durante varias semanas en presencia de la microflora natural (De-Basham et al., 2007; Bouizgarne, 2013; Domingues et al., 2020). En este caso la presencia de microorganismos en el vermicompost pudo haber afectado el número de *A. brasilense* en este inoculante y por lo tanto su presencia en la semilla de arroz. Algunos autores refieren que para la mayoría de

semillas de gramíneas inoculadas con *Azospirillum*, no hay efecto positivo en la promoción del crecimiento, debido a que no tiene la capacidad de penetrar en las raíces, por lo que quedan expuestas a la competencia por espacio y nutrientes con otros microorganismos situados en la rizosfera afectando su establecimiento (Noumavo et al., 2016).

El éxito de la inoculación de una bacteria y su eficiencia en la promoción del crecimiento vegetal, aparte de la cepa utilizada, depende del número de células necesarias o viables para la rápida colonización y supervivencia en la rizosfera, tolerancia a condiciones de salinidad, estrés por sequía, pH, humedad del suelo (Domingues et al., 2020). Por lo que, posiblemente la baja presencia de *Azospirillum* en el vermicompost, impidió una respuesta eficaz de la bacteria sobre los parámetros de crecimiento de las plantas, por lo que ninguna variable mostró alguna diferencia significativa en relación con las plantas no inoculadas con la bacteria. Por otra parte, este medio de inóculo demostró ser eficiente en otros estudios, donde al inocular la bacteria a una concentración 10^8 UFC/g presentó efectos positivos en las plantas de arroz en las mediciones de altura, longitud de raíz, peso fresco y seco aéreo y de raíz, sin embargo, en ese caso sí se logró determinar la concentración de *Azospirillum* en el vermicompost ($2,8 \times 10^8$ UFC/g) en el momento de la inoculación de las semillas de arroz (Sánchez, 2020).

6.2.3. Inoculante liofilizado

En la fabricación de bioinoculantes mediante procesos como la liofilización, existen varios factores que pueden afectar la viabilidad celular, como el estrés por desecación al deshidratar el medio en que se encuentran, principalmente para bacterias Gram-negativas que no forman esporas como el caso de *Azospirillum*, el tiempo de almacenamiento durante la congelación (las bacterias permanecen en un estado latente por lo que su metabolismo disminuye), estrés por hidratación de las células en el momento que se reactivan para la inoculación antes de ser aplicados a la semilla o al suelo, entre otras circunstancias que afectan la calidad y supervivencia de la población bacteriana, como el medio de cultivo utilizado para su crecimiento y el uso de materiales de protección que le permitan establecerse en la rizosfera (González de Bashan et al., 2021).

En esta investigación *A. brasilense* logró resistir el proceso de liofilización, para poder utilizar la bacteria como inoculante se realizó un paso adicional, hidratar la bacteria en un medio de cultivo de Dygs (anexo 4), lo que permitió alcanzar la población bacteriana deseada para preparar las concentraciones de los tratamientos, además que, tanto en el proceso de liofilización e hidratación con Dygs se utilizó como ingrediente melaza y otros ingredientes como el glicerol, utilizado como protector celular, dado que, por su estructura química, tiene la propiedad de reducir la cantidad de hielo que se produce al someter las células a temperaturas bajas, evita el incremento de la concentración iónica y permite una mayor adhesión de las bacterias a las semillas (González et al., 2007; Aguilar, 2020).

La baja respuesta de las variables de crecimiento a la inoculación de la bacteria a diferentes concentraciones se debe probablemente a que, a las semillas de arroz en el tratamiento testigo sin inocular, se adicionó el medio de cultivo utilizado para la liofilización (anexo 3), debido a la concentración de azúcar en dicho medio, pudo haber favorecido el crecimiento de las plantas en el tratamiento testigo. Al respecto, algunas investigaciones reportan el uso de sacarosa y concentraciones bajas de oligosacáridos como bioestimulantes en la germinación de semillas de arroz, lo que promueve la actividad de la enzima amilasa, transmisión de señales y transporte de auxinas en raíces (Udchumpisai et al., 2022). Los autores indican que este tratamiento mejoró el porcentaje y tiempo de germinación de las semillas entre un 17 y 19 %, mayor crecimiento de las plantas con una longitud radical y de brotes de 68,9 y 51,6 mm, respectivamente, mientras que, las de semillas tratadas con agua fueron de 9,3 y 34,7 mm, respectivamente. (Udchumpisai et al., 2022).

El peso fresco de la parte aérea y radicular fue inferior en la concentración de 10^9 UFC/ml que, en los otros tratamientos inoculados, lo que posiblemente sea un efecto de la concentración más alta de la bacteria en el momento de inocular las semillas. Algunos autores indican que la aplicación del inóculo a concentraciones superiores a 10^8 UFC puede presentar un efecto inhibitorio sobre el desarrollo vegetal (Bashan & Levanony, 1990; Dobbelaere et al., 2002; Sánchez, 2020). Al respecto, Sánchez (2020) encontró que cuando utilizó inóculo líquido con una concentración de $8,5 \times 10^9$ bacterias/ml para la inmersión de semillas, no hubo efecto sobre el crecimiento de las plantas. La autora atribuyó este resultado a que la concentración del inóculo líquido de *A. brasilense* era muy alta, lo que causó un efecto

inhibitorio en el crecimiento y desarrollo de las semillas, de forma similar a la aplicación exógena de fitohormonas, ya que estas trabajan de forma más eficiente a concentraciones bajas (Alcantara et al., 2019).

Una forma de garantizar el establecimiento exitoso de *A. brasilense* en procesos de liofilización es la encapsulación de células microbianas vivas con polímeros, como alginato y poliacrilamida, sin embargo, son procedimientos que requieren de mano de obra calificada, equipo especializado y conlleva altos costos en su producción (Santos et al., 2019).

El potencial de *A. brasilense* como inoculante depende en gran medida del medio utilizado como acarreador, dado que este puede beneficiar o afectar el crecimiento de la bacteria en el inóculo, por ende su supervivencia en la colonización de las semillas o raíces de las plantas de arroz, para observar un efecto positivo en las variables de crecimiento de las plantas que, al final se llega a traducir en un buen rendimiento, sin necesidad de recurrir a fuentes de fertilizantes químicos o al menos llegar a reducir la dependencia de estos en un porcentaje.

7. CONCLUSIONES

La formulación líquida de *Azospirillum* en melaza a una concentración de 10^8 UFC/ml presentó una tendencia positiva sobre el crecimiento de las plantas de arroz de la variedad Palmar 18.

El efecto potencial de la bacteria *A. brasilense* sobre las plantas de arroz, no se pudo evidenciar en el inoculante vermicompost debido a la interferencia de otros microorganismos.

En el inoculante liofilizado, la concentración mayor 10^9 UFC/ml presentó un peso fresco aéreo y de raíz menor en las plantas, con respecto a los otros tratamientos inoculados con la bacteria (10^7 y 10^8 UFC/ml).

8. RECOMENDACIONES

Se recomienda realizar el ensayo bajo condiciones de campo en el cultivo del arroz, para así evidenciar el efecto de las bacterias sobre las plantas. Al mismo tiempo, efectuar este mismo ensayo con otras variedades de arroz más actuales como Senumisa 20.

Continuar realizando estudios sobre el inoculante de vermicompost como medio de inóculo para *A. brasilense*, dado que este posee propiedades nutricionales importantes que favorecen el crecimiento de las plantas.

En futuras investigaciones, se recomienda el uso de dosis creciente de fertilizante N-P-K en combinación con la bacteria *A. brasilense*, para observar el efecto sobre el crecimiento de las plantas.

Para establecer con éxito la simbiosis de *A. brasilense* con las plantas, se recomienda realizar varias aplicaciones del inóculo en diferentes etapas del cultivo, para estudiar más a fondo el efecto de la bacteria sobre el crecimiento y desarrollo de las plantas de arroz.

9. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Aguilar, A. (2020). *Producción masiva de Azospirillum spp., formulación, control de calidad y su uso en la agricultura: Revisión de Literatura*. [Tesis de Licenciatura. Escuela Agrícola Panamericana, Zamorano]. Biblioteca digital Zamorano. <https://bdigital.zamorano.edu/handle/11036/6789>

Aguirre, R. (2018). *Efecto de rizobacterias promotoras de crecimiento (RPC) sobre el arroz (Oryza sativa L.) en invernadero bajo condiciones de estrés hídrico*. [Tesis de Licenciatura, Universidad de Costa Rica]. Repositorio SIBDI de la Universidad de Costa Rica. <http://repositorio.sibdi.ucr.ac.cr:8080/jspui/handle/123456789/6323>

Alcantara, J., Acero, J., Alcantara, J., & Sánchez, R. (2019). Principales reguladores hormonales y sus interacciones en el crecimiento vegetal. *NOVA*, 17(32), 109-129. <https://doi.org/10.25058/24629448.3639>

- Alfaro, K. (11 de mayo de 2022). Fertilizantes podrían subir hasta un 70 % más tras la invasión rusa. *El Economista*. <https://www.economista.net/actualidad/Fertilizantes-podrian-subir-hasta-un-70--mas-tras-la-invasion-rusa--20220511-0022.html>.
- Andrews, M., James, E., Cummings, S., Zavalin, A., Vinogradova, L., & McKenzie, B. (2003) Use of nitrogen fixing bacteria inoculants as a substitute for nitrogen fertilizer for dryland Gramineous crops: progress made, mechanisms of action and future potential. *Symbiosis*, 35 (1),209–229.
- Artavia, S., Uribe, L., Arauz, L., Saborío, F., & Castro, L. (2010). Efecto de la aplicación de abonos orgánicos en la supresión de *Pythium myriotylum* en plantas de tiquisque (*Xanthosoma sagittifolium*). *Agronomía Costarricense*, 34(1), 17–29. https://www.scielo.sa.cr/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S037794242010000100002
- Bashan, Y., De-Bashan, L., Prabhu, S., & Hernández, J. (2014). Advances in plant growth-promoting bacterial inoculant technology: formulations and practical perspectives (1998–2013). *Plant Soil*, 378, 1–33. <https://doi.org/10.1007/s11104-013-1956-x>
- Bashan, Y., & Levanony, H. (1990). Current status of *Azospirillum* inoculation technology: *Azospirillum* as a challenge for agriculture. *Canadian Journal of Microbiology*, 36(9), 591-608. <https://doi.org/10.1139/m90-105>
- Beltrán, M., & Bernal, A. (2022). Biofertilizantes: alternativa biotecnológica para los agroecosistemas. *Revista Mutis*, 12(1). <https://doi.org/10.21789/22561498.1771>
- Bhardwaj, D., Ansari, M., & Sahoo, R. (2014). Biofertilizers function as key player in sustainable agriculture by improving soil fertility, plant tolerance and crop productivity. *Microb Cell Fact*, 13 (66). <https://doi.org/10.1186/1475-2859-13-66>
- Bouizgarne, B. (2013). Bacteria for plant growth promotion and disease management. In: Maheshwari, D. (eds) *Bacteria in Agrobiolgy: Disease Management*. Springer. https://doi.org/10.1007/978-3-642-33639-3_
- Brahmaprakash, G., & Kumar, P. (2012). Biofertilizers for sustainability. *Journal of the*

- Indian Institute of Science*, 92(1), 37-62.
<http://journal.library.iisc.ernet.in/index.php/iisc/article/view/22/22>
- Brasil, M., Silva, M., Lima, S., Koswoski, S., & Winkler, M. (2021). Initial development of upland rice plants inoculated with the MAY12 strain of *Azospirillum* spp. *Ciencia Rural*, 51(12), 1-10. <https://doi.org/10.1590/0103-8478cr20200824>
- Bouizgarne, B. (2013). Bacteria for plant growth promotion and disease management. In: Maheshwari, D. (eds) *Bacteria in Agrobiolgy: Disease Management*. Springer. https://doi.org/10.1007/978-3-642-33639-3_
- Cárdenas, L., Gómez, J., Arenas, M., & Serna, J. (2019). Evaluación de melaza como medio de cultivo para la producción de bacterias ácido-lácticas. *UGCiencia*, 24(1), 17-22. <https://doi.org/10.18634/ugcj.24v.1i.919>
- Castellano, M., Espinosa, C., & Fernández, M. (2015). Uso de *Azospirillum* en la agricultura. *Revista Científica Agroecosistemas*, 3(1), 401-4013. <https://aes.ucf.edu.cu/index.php/aes/article/view/26>
- Cerna, E., Mendoza, E., & Contreras, S. (2021). Grain yield of maize hybrids in response to inoculation with *Azospirillum* sp. under nitrogen limiting conditions in Huaura, Perú. *Sustainable Agriculture Research*, 10(1), 1-9. <https://doi.org/10.5539/sar.v10n1p1>
- Chamam, A., Sanguin, H., Bellvert, F., Meiffren, G., Comte, G., Wisniewski-Dyé, F., Bertrand, C., & Prigent, C. (2012). Plant secondary metabolite profiling evidences strain-dependent effect in the *Azospirillum*–*Oryza sativa* association. *Phytochemistry*, (87), 65-77. <http://dx.doi.org/10.1016/j.phytochem.2012.11.009>
- Chavarría, L. (2011). *Crecimiento y absorción de nutrimentos en dos cultivares de arroz (Oryza sativa L) en la región Pacífico Central*. [Tesis de Licenciatura, Universidad de Costa Rica] Repositorio SIBDI de la Universidad de Costa Rica. <http://repositorio.sibdi.ucr.ac.cr:8080/jspui/handle/123456789/2259>

- Chávez, E., Hernández, A., Castro, E., & García, E. (2018). Effect of *Azospirillum brasilense* Sp245 Lipopolysaccharides on Wheat Plant Development. *Journal of Plant Growth Regulation*, 37,859–866. <https://doi.org/10.1007/s00344-018-9782-2>
- Contreras, B., López, S., Reyes, J., & Cárdenas, D. (2011). Producción de un inoculante a base de rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal. *Respuestas*, 16(2), 20-29. <https://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=5364556>
- CONARROZ (Corporación Arroceras Nacional). (2021). *Informe anual estadístico 2020/2021*. https://www.conarroz.com/userfile/file/Informe_anual_estad%C3%ADstico2020-2021.pdf
- CONARROZ (Corporación Arroceras Nacional). (2022). *Informe anual estadístico 2021/2022*. https://www.conarroz.com/userfile/file/Presentacion_informe_anual2021_2022.pdf
- De-Bashan, L. E., Holguin, G., Glick, B., & Bashan, Y. (2007). Bacterias promotoras de crecimiento en plantas para propósitos agrícolas y ambientales. En R. Ferrera-Cerrato, & A. Alarcon, A (Eds.), *Microbiología agrícola: hongos, bacterias, micro y macrofauna, control biológico, planta-microorganismo* (pp.170-224). Trillas.
- Dellagi, A., Quillere, I., & Hirel, B. (2020). Beneficial soil-borne bacteria and fungi: a promising way to improve plant nitrogen acquisition. *Journal of Experimental Botany*, 71(15), 4469-4479. <https://doi.org/10.1093/jxb/eraa112>
- Díaz, Y., Díaz-de los Ríos, M.; Alberto, M., Nuñez, A., Martínez, M. (2013). Crecimiento de *Azospirillum brasilense* en presencia de disacáridos: sacarosa y lactosa. *Instituto Cubano de Investigaciones de los Derivados de la Caña de Azúcar*, 47 (2) 23-30. <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=223128548004>
- Dobbelaere, S., Croonenborghs, A., Thys, A., Ptacek, D., Okon, Y., & Vanderleyden, J. (2002). Effect of inoculation with wild type *Azospirillum brasilense* and *A. irakenses* strains on development and nitrogen uptake of spring wheat and grain maize. *Biology*

and Fertility of Soils, 36(4), 284 -297. <https://doi.org/10.1007/s00374-002-0534-9>

- Domingues, C., Cecato, U., Trento, T., Mamédio, D., & Galbeiro, S. (2020). *Azospirillum* spp. en gramíneas y forrajeras. Revisión. *Revista mexicana de ciencias pecuarias*, 11(1), 223-240. <https://doi.org/10.22319/rmcp.v11i1.4951>
- Domínguez, J., Lazcano, C., & Gómez, M. (2010). Influencia del vermicompost en el crecimiento de las plantas. Aportes para la elaboración de un concepto objetivo. *Acta Zoológica Mexicana*, 2, 359-371. <https://doi.org/10.21829/azm.2010.262900>
- Durán, L., & Henríquez, C. (2007). Caracterización química, física y microbiológica de vermicompost producidos a partir de cinco sustratos orgánicos. *Agronomía Costarricense*, 31(1), 41–51. <https://revistas.ucr.ac.cr/index.php/agrocost/article/view/6818>
- Fukami, J., Nogueira, M., Silva, R., & Humgria, M. (2016). Accessing inoculation methods of maize and wheat with *Azospirillum brasilense*. *AMB Express*, 6(3), 2-13. <https://doi.org/10.1186/s13568-015-0171-y>
- Galindo, F., Teixeira, M., Buzetti, S., Alves, C., Santini, J., Ludkiewicz, M., Andreotti, M., & Bellote, J. (2016). Corn Yield and Foliar Diagnosis Affected by Nitrogen Fertilization and Inoculation with *Azospirillum brasilense*. *Revista Brasileira de Ciencia do Solo*, 40, article e0150364. <https://doi.org/10.1590/18069657rbcs20150364>
- Gamarelo, E., & Glick, B. (2011). *Mechanisms used by plant growth promoting bacteria. In Bacteria in Agrobiolgy. Plant Nutrient Management* (17-46). Springer, Berlín, Heidelberg. https://doi.org/10.1007/978-3-642-21061-7_2
- García, C., & Sato, M. (2019). Técnicas de Aislamiento, Identificación, Selección de cepas de *Rhizobium*, *Azospirillum* y Producción de inoculantes. *Revista Investigación*, 27(1), 175-195. <https://doi.org/10.51440/unsch.revistainvestigacion.2019.1.119>
- García, F., Muñoz, H., Carreño, C., & Mendoza, G. (2010). Caracterización de cepas nativas de *Azospirillum* spp. y su efecto en el desarrollo de *Oryza sativa* L. “arroz” en Lambayeque. *Scientia Agropecuaria*, 1(2), 107-116. <https://doi.org/10.17268/sci.agropecu.2010.02.01>

- González, A., Alcocer, R., Zamudio, M. (2007). Evaluación de crioprotectores y temperaturas de recuperación en la conservación a largo plazo de Bacterias Ácido Lácticas. XII Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería. *Sociedad Mexicana de Biotecnología y Bioingeniería*. https://smbb.mx/congresos%20smbb/morelia07/VI_biotecybiodymicrob.html.
- González de Bashan, L., Legorreta, M., Hernández, J., & Mendoza, J. (2021). Métodos de aplicación de biofertilizantes bacterianos. *Corporación colombiana de investigación agropecuaria – AGROSAVIA*. <http://hdl.handle.net/20.500.12324/37082>
- Guimarães, V. F., Klein, J., Barboza, M., & Klestring, D. (2020). Promotion of rice growth and productivity as a result of seed inoculation with *Azospirillum brasilense*. *African Journal of Agricultural Research*, 16(6), 765–776. <https://doi.org/10.5897/ajar2020.14723>
- Henríquez, C., Cabalceta, G., Bertsch, F., & Alvarado, A. (2011). Asociación Costarricense de la Ciencia del Suelo: Principales suelos de Costa Rica. *Sistema de Información del Sector Agropecuario Costarricense*. <http://www.infoagro.go.cr/Info regiones/RegionCentralOriental/Documents/Suelos/tipos%20de%20suelos%20CR.pdf>
- Hernández, A. (2018). *Preservación efectiva mediante liofilización de cepas del inoculante multiespecies EMMIM-I*. [Tesis de maestría, Benemérita Universidad Autónoma de Puebla]. Repositorio institucional de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla. <https://repositorioinstitucional.buap.mx/handle/20.500.12371/7830>
- Kannan, T., Ponmurugan, P. T. (2010). Response of Paddy (*Oryza sativa* L.) Varieties to *Azospirillum brasilense* Inoculation. *Journal of Phytology*, 2(6) 8-13. <https://updatepublishing.com/journal/index.php/jp/article/view/2136>
- Koul, V., & Kochar, M. (2021). A novel essential small RNA, sSp_p6 influences nitrogen fixation in *Azospirillum brasilense*. *Rhizosphere*, 17, article e100281. <https://doi.org/10.1016/j.rhisph.2020.100281>

- Lagler, J. (2017). Bioinsumos: Distintas percepciones haciendo foco en la fertilización biológica. *Agronomía y Ambiente*, 37(1), 73-89. <http://agronomiayambiente.agro.uba.ar/index.php/AyA/article/view/65>
- Lara, C., Álvarez, A., & Oviedo, L. (2013). Impacto de inoculación con la bacteria nativa *Azospirillum* sobre *Oryza sativa* L. en Córdoba–Colombia. *Biotecnología en el Sector Agropecuario y Agroindustrial*, 11(2), 37-45.
- Licea, J., Quiroz, J., & Hernández, J. (2020). Impacto de *Azospirillum brasilense*, una Rizobacteria que estimula la producción del Ácido Indol-3-Acético como el mecanismo de mejora del crecimiento de las plantas en los cultivos agrícolas. *Revista Boliviana de Química*, 37(1), 34-39.
- Llerena, L., Reyes, J., Álvarez, A., & Pincay, R. (2021). Respuesta agronómica del cultivo del arroz a la inoculación con bacterias promotoras del crecimiento vegetal. *Centro Agrícola*, 48 (3), 5-10.
- Mahanty, T., Bhattacharjee, S., Goswami, M; Bhattacharyya, P., Das, B., Ghosh, A., & Tribedi, P. (2017). Biofertilizers: a potential approach for sustainable agriculture development. *Environmental Science and Pollution*, 24, 3315–3335. <https://doi.org/10.1007/s11356-016-8104-0>
- Moquete, C. (2010). *Guía técnica: El cultivo de arroz* (Publicación No. 37). Centro para el Desarrollo Agropecuario y Forestal. <https://xdoc.mx/documents/el-cultivo-de-arroz-5ce45b7b941bc>
- Numavo, P., Agbodjato, N., & Baba-Moussa, F. (2016). Plant growth promoting rhizobacteria: Beneficial effects for healthy and sustainable agriculture. *Africa Journal Biotechnology*, 15(27), 1452-1463. <https://doi.org/10.5897/AJB2016.15397>
- Owen, D. Williams, A. Griffith, G., & Withers, P. (2015). Use of commercial bio-inoculants to increase agricultural production through improved phosphorus acquisition. *Applied Soil Ecology*, 86, 41–54. <https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2014.09.012>
- Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO). (2016).

Ahorrar para crecer en la práctica: maíz, arroz, trigo. Guía para la producción sostenible de cereales. <http://www.fao.org/3/i4009s/i4009s.pdf>

- Pedraza L., López C y Uribe, D. (2020) Mecanismos de acción de *Bacillus* spp. (Bacillaceae) contra microorganismos fitopatógenos durante su interacción con plantas. *Acta Biológica Colombiana*. 25(1),112-125. <http://dx.doi.org/10.15446/abc.v25n1.75045>
- Petrecolla, D. (2006). *Costa Rica Agrocadena del Arroz, Estudio Sectorial de Competencia* (Informe final) Corporación Financiera Internacional. <https://www.coprocom.go.cr/publicaciones/informes/InformeFinalArroz.pdf>
- Puente, M., Garcia, J., Maroniche, G., Arguissain, G., Pirchi, H, & Peticari, A. (2013). Plant-Growth Promotion of Argentinean Isolates of *Azospirillum brasilense* on Rice (*Oryza sativa* L.) Under Controlled and Field Conditions. *American-Eurasian Journal. Agriculture & Environment. Sci.* 13 (10) 1361-1369. <http://dx.doi.org/10.5829/idosi.aejaes.2013.13.10.11236>
- Roy, M., Saha, S., Das, J., & Srivastava, R. (2015). Technologies of microbial inoculation in rice. *Agricultural Reviews*. 36(2), 125. <http://dx.doi.org/10.5958/0976-0741.2015.00014.8>
- Sánchez, E. (2020). *Evaluación de acarreadores sólidos para la producción de un inoculante a base de Azospirillum brasilense y su efecto sobre la germinación y el crecimiento de arroz bajo condiciones de laboratorio e invernadero.* [Tesis licenciatura, Universidad de Costa Rica]. Repositorio SIBDI de la Universidad de Costa Rica. <http://repositorio.sibdi.ucr.ac.cr:8080/jspui/bitstream/123456789/16294/1/45513.pdf>
- Sangoquiza, C., Viera, Y., & Yáñez, C. (2018). Respuesta biológica de aislados de *Azospirillum* spp. frente a diferentes tipos de estrés. *Revista Centro Agrícola*, 45(1), 40-46.
- Santos, M., Nogueira, M. & Hungria, M. (2019). Microbial inoculants: reviewing the past, discussing the present and previewing an outstanding future for the use of beneficial

bacteria in agriculture. *AMB Express* (9) 205. <https://doi.org/10.1186/s13568-019-0932-0>

Saranraj, Al-Tawaha, A., Sivassakthivelan, P., Al-Tawaha, A., Kangasalam, A., Thangadurai, D., Sangeetha, J. (2022). *Azospirillum* Bioinoculant Technology: Past To Current Knowledge And Future Prospects. Sangeetha, J., Soyong, K., Thangadurai, D., & Al-Tawaha, A. (Eds.) *Organic Farming for Sustainable Development*. (1) *Apple Academic Press*. <https://doi.org/10.1201/9781003284055>

Sharma, A., Shankhdhar, D., Sharma, A., & Shankhdhar, S. (2014). Growth promotion of the rice genotypes by pgprs isolated from rice rhizosphere. *Journal of soil science and plant nutrition*, 14(2), 505-517. <https://dx.doi.org/10.4067/S0718-95162014005000040>

Thomas, J., Kim, H. R., Rahmatallah, Y., Wiggins, G., Yang, Q., Singh, R., Glazko, G., & Mukherjee, A. (2019). RNA-seq reveals differentially expressed genes in rice (*Oryza sativa*) roots during interactions with plant-growth promoting bacteria, *Azospirillum brasilense*. *PLoS ONE*, 14(5), article e217309. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0217309>

Udchumpisai, W., Uttapap, D., Wandee, Y., Kotatha, D., & Rungsardthong, V. (2022). Promoting Effect of Pectic-Oligosaccharides Produced from Pomelo Peel on Rice Seed Germination and Early Seedling Growth. *Journal of Plant Growth Regulation* <https://doi.org/10.1007/s00344-022-10690-6>

Ullah, M., Bashir, A., & Sajjad, M. (2014). Response of rice to inoculation with plant growth promoting rhizobacteria in control lab environment and field experiment. *Pakistan Journal Botany*, 46(3), 1121-1124.

Vignola, R., Poveda, K., Watler, W., Vargas, A., Berrocal, A., & Morales, M. (2018). *Prácticas efectivas para la reducción de impactos por eventos climáticos en Costa Rica-Cultivo de arroz*. Ministerio de Agricultura y Ganadería. <http://www.mag.go.cr/bibliotecavirtual/reduccion-impacto-por-eventos-climaticos/Informe-final-Arroz.pdf>

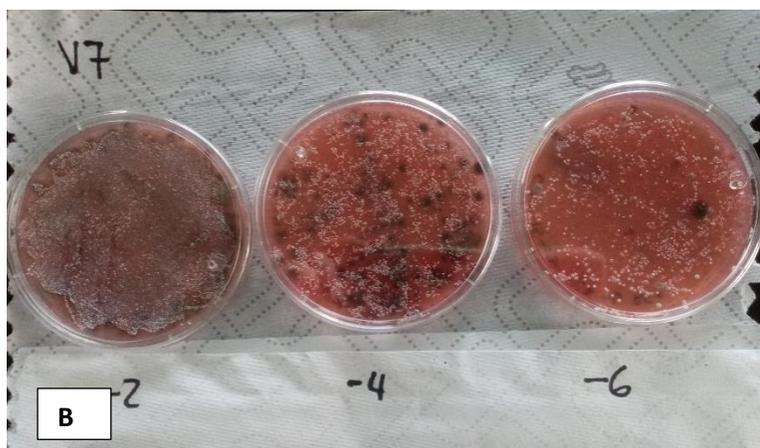
- Viñals, M., & Villar, J. (1999). Avances en la formulación y aplicación de inoculantes bacterianos de uso agrícola. *Cultivos Tropicales*, 20(4), 9-17.
- Wiggins, G. (2020). *Using molecular genetic approaches to investigate the associations between rice and plant growth promoting bacteria, Azospirillum brasilense*. [Tesis de Maestría, Universidad Central de Arkansas]. ProQuest. <https://search.proquest.com/openview/83e90a245a82da8b748f04652f2955bd/1?pq-origsite=gscholar&cbl=18750&diss=y>
- Zeffa, D., Perini, L., Barbosa, M., Vieira, N., Scapim, C., Martínez, L., Teixeira, A., & Azeredo, L. (2019). *Azospirillum brasilense* promotes increases in growth and nitrogen use efficiency of maize genotypes. *PLOS ONE*, 14(4), article e0215332. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0215332>

10. ANEXOS

Anexo 1. Análisis químico del suelo del lote arrocero Hacienda Mojica, Guanacaste.

 UNIVERSIDAD DE COSTA RICA													
CIUDAD DE LA INVESTIGACIÓN LABORATORIO DE SUELOS Y FOLIARES REPORTE DE ENSAYO RE-R01 (V3)													
Nº DE REPORTE: 79486													
USUARIO:	LABORATORIO DE MICROBIOLOGIA												
SUBCLIENTE	TESIS GABRIELA ALFARO QUESADA												
RESPONSABLE:	LIDIETH URIBE												
CORREO	lidieth.uribe@ucr.ac.cr												
TELÉFONO:	2511-2077												
PROVINCIA:	GUANACASTE	ANÁLISIS:	QC, CN										
CANTÓN:	CAÑAS	FECHA RECEPCIÓN:	08/11/2021										
LOCALIDAD	CAÑAS	EMISIÓN DE REPORTE:	18/11/2021										
CULTIVO:	ARROZ	Nº DE MUESTRAS TOTAL:	1										
		PÁGINA:	1/2										
ANÁLISIS QUÍMICO DE SUELOS													
Solución Extractora:		pH	cmol(+)/L					%	mg/L				
KCI-Olsen Modificado		H ₂ O	ACIDEZ	Ca	Mg	K	CICE	SA	P	Zn	Cu	Fe	Mn
ID USUARIO	ID LAB	5,5	0,5	4	1	0,2	5		10	3	1	10	5
MUESTRA FINCA MOJICA	S-21-06305	6,2	0,10	13,07	6,04	0,44	19,65	0,5	8	4,4	14	95	35
-----ÚLTIMA LÍNEA-----													
Los valores debajo de cada elemento corresponden con los Niveles Críticos generales para la solución extractora usada													
CICE=Capacidad de intercambio de Cationes Efectiva=Acidez+Ca+Mg+K							SA=Porcentaje de Saturación de Acidez=(Acidez/CICE)*100						
OBSERVACIÓN: Enviar reporte a Gabriela: m6alfaro@gmail.com													

Anexo 2. Presencia de otros microorganismos en inoculante de vermicompost, A: tratamiento testigo. B: concentración de *A. brasilense* 10^7 UFC/ml. Recuento mediante plateo en medio Ácido Málico Rojo Congo.



Anexo 3. Medio de cultivo líquido de melaza.

Reactivo	Cantidad
Sacarosa	3 g/l
Melaza	6,75 ml/l
Glicerol	0,77 ml/l
Soya granular	2,16 g/l
Extracto de levadura	0,848 g/l
K ₂ HPO ₄	0,25 g/l

Anexo 4. Medio de cultivo Dygs.

Reactivo	Cantidad g/l
$K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$	0,5 g/l
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0,5 g/l
Glucosa	2 g/l
Peptona universal	1,5 g/l
Extracto de levadura	2 g/l
Ácido glutámico	1,5 g/l
Ácido málico	2 g/l
pH 7-6,8	

Anexo 5. Agar de cultivo Ácido Málico-Rojo Congo.

Reactivo	Cantidad g/l
K_2HPO_4	0,5 g/l
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0,2 g/l
NaCl	0,1 g/l
Extracto de levadura	0,5 g/l
$FeCl_3 \cdot 6 H_2O$	0,01 g/l
Ácido Málico	5 g/l
KOH	4,8 g/l
pH 7: Ajustar con KOH 1N (5,61 g en 100 ml)	
Agar	20 g/l

Anexo 6. Medio de cultivo caldo nutritivo.

Reactivo	Cantidad g/l
Peptona	5 g/l
Extracto de carne	3g/l

Anexo 7. Tratamientos con *A. brasilense* con diferentes inoculantes a una concentración de 10^8 UFC. A: Inoculante líquido de melaza. B: inoculante vermicompost. C: inoculante liofilizado, T: tratamientos testigos respectivos a su inoculante (izquierda).

