

**EVALUACIÓN DEL VALOR COMO BIOFERTILIZANTES DE *Nostoc* sp. Y
Anabaena sp. EN PLÁNTULAS DE MENTA (*Mentha spicata*)**

GIOVANNI ANDRÉS ORTIZ MÉNDEZ

Tesis de grado para optar al título de Ingeniero Ambiental

**Directora:
Aida Vanessa Wilches
Bióloga, MSc.**

**Codirector:
François Herrera Jacquelin
Biólogo, MSc.**



**UNIVERSIDAD SANTO TOMÁS
FACULTAD DE INGENIERÍA AMBIENTAL
BOGOTÁ, D.C.
2015**

Nota de aceptación

Firma del presidente del jurado

Firma del jurado

Firma del jurado

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, el agradecimiento es para Dios por haber hecho posible la realización de toda esta investigación y a mis padres por haberme permitido llegar hasta donde estoy.

En segundo lugar quiero agradecer a los docentes François Herrera y Aida Wilches por haberme permitido vincularme a la Universidad Central. A esta universidad le agradezco por permitirme pertenecer a su grupo de investigación, por abrirme las puertas de sus instalaciones y de su laboratorio, por permitirme desarrollar esta investigación con recursos de la misma. También agradezco a los directores del grupo de investigación y a todos sus docentes (María González, Ana Rozo y demás) en especial a Aida Wilches y Ángela Navas, por la paciencia y su tiempo dedicado a guiarme durante todo el proceso práctico; espero que yo les haya servido de gran ayuda.

En tercer lugar a todos los integrantes del grupo de investigación, incluyendo los estudiantes de la Universidad Central y los tesisistas de pregrado Diana Polanía y Carlos Silva; a todos mis familiares, a mi esposa y mis amigos por todo su apoyo durante los últimos días.

A todos ustedes les agradezco de todo corazón.

CONTENIDO

RESUMEN	10
1. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	11
2. MARCO TEÓRICO	12
2.1 Importancia del nitrógeno como elemento de fertilización	12
2.2 Importancia de los fertilizantes nitrogenados.....	12
2.3 Impactos ambientales de la fertilización por nitrógeno	13
2.4 Los biofertilizantes	14
2.5 Uso de bacterias como biofertilizantes	14
2.5.1 Taxonomía de <i>Azotobacter</i> sp.....	15
2.5.2 Las cianobacterias y su uso como biofertilizantes.....	15
3. OBJETIVOS.....	20
3.1 Objetivo general.....	20
3.2 Objetivos específicos.....	20
4. JUSTIFICACIÓN.....	21
5. DELIMITACIÓN	22
6. METODOLOGÍA	23
6.1 Protocolo para la identificación y cultivo monoespecífico de <i>Anabaena</i> sp. a partir de muestras tomadas en el humedal de Guaymaral	23
6.1.1 Aislamiento e identificación de la cepa.....	23
6.1.2 Reproducción en medio semisólido y líquido	27
6.1.3 Preparación de las soluciones de <i>Anabaena</i> sp. a inocular en las plántulas, a partir de la curva de crecimiento	29
6.2 Reproducción y preparación de las soluciones a inocular de <i>Nostoc</i> sp.	32
6.3 Reproducción y preparación de las soluciones a inocular de <i>Azotobacter</i> sp.	35
6.4 Ensayos preliminares para la evaluación del valor como biofertilizantes de <i>Anabaena</i> sp. y <i>Nostoc</i> sp.....	38
6.5 Obtención y propagación del material vegetal utilizado en el bioensayo.....	40
6.6 Diseño experimental	40

6.6.1 Descripción de los factores, niveles y tratamientos	40
6.6.2 Descripción de la inoculación	41
6.6.3 Unidad experimental.....	44
6.6.4 Variable de respuesta.....	45
6.7 Análisis de los datos	46
6.8 Análisis estadístico	47
6.8.1 Análisis del efecto principal de los géneros de bacterias y de sus respectivas concentraciones	47
6.8.2 Análisis de las diferencias entre los géneros de bacteria y el testigo	47
6.8.3 Prueba de comparación múltiple de Fisher (LSD) Diferencia Mínima Significativa	48
7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	49
7.1 Análisis del efecto principal de los tipos de bacteria y sus concentraciones sobre el crecimiento de las plántulas de menta.....	49
7.2 Análisis del efecto de cada una de las fuentes de nitrógeno sobre el crecimiento de las plántulas de menta.....	50
7.2.1 Prueba de comparación múltiple de Fisher (LSD) Diferencia Mínima Significativa para comparar las fuentes de nitrógeno	51
7.3 Análisis comparativo de cada una de las concentraciones de cada una de las bacterias inoculadas	52
7.3.1 Comparación entre las distintas concentraciones de <i>Anabaena</i> sp.	52
7.3.2 Comparación entre las distintas concentraciones de <i>Nostoc</i> sp.	53
7.3.3 Comparación entre las distintas concentraciones de <i>Azotobacter</i> sp. ...	55
7.3.4 Comparación entre las concentraciones con los más altos porcentajes de incremento de cada una de las bacterias inoculadas.....	57
8. CONCLUSIONES	58
9. RECOMENDACIONES.....	59
REFERENCIAS	60
ANEXOS.....	65
Anexo No. 1 Fotografía de <i>Azotobacter</i> sp. con tinción de Gram.....	65
Anexo No. 2 Fotografía de <i>Anabaena</i> sp.....	66
Anexo No. 3 Fotografía de <i>Nostoc</i> sp.....	67

Anexo No. 4 Composición del medio Bold's Basal Medium (BBM).	68
Anexo No. 5 Composición del medio BG11.....	69
Anexo No. 6 Composición del medio BG11(0).	70
Anexo No. 7 Composición del medio de Ashby.	71
Anexo No. 8 Composición del medio Murashige & Skoog (MS).	72
Anexo No. 9 Caja de LEDs elaborada en laboratorio para realizar la curva de crecimiento de las cianobacterias.....	73

ÍNDICE DE TABLAS

1. Biomasa de cada concentración de <i>Anabaena</i> sp. ¡Error! Marcador no definido.	
2. Biomasa de cada concentración de <i>Nostoc</i> sp	34
3. Diluciones de <i>Azotobacter</i> sp.....	35
4. Soluciones del Estándar de Mc Farland	36
5. Concentración de bacterias de cada tubo de <i>Azotobacter</i> sp.....	37
6. Tratamientos con los distintos tipos de microorganismos incluidos en el estudio	41
7. Fechas de peso inicial, peso final, inoculación 1, inoculación 2 en el bioensayo y cantidades inoculadas	43
8. ANOVA de dos vías para comparar todos los tratamientos	50
9. ANOVA de una vía para comparar las fuentes de nitrógeno y el testigo absoluto	50
10. Matriz de probabilidad de la prueba LSD	50
11. Matriz de rechazo de la prueba LSD.....	50
12. ANOVA de una vía para comparar las concentraciones de <i>Anabaena</i> sp.....	51
13. ANOVA de una vía para comparar las concentraciones de <i>Nostoc</i> sp.....	53
14. Matriz de probabilidad de la prueba LSD para comparar las concentraciones de <i>Nostoc</i> sp.....	54
15. Matriz de rechazo de la prueba LSD para comparar las concentraciones de <i>Nostoc</i> sp.....	54
16. ANOVA de una vía para comparar las concentraciones de <i>Azotobacter</i> sp	55
17. Matriz de probabilidad de la prueba LSD para comparar las concentraciones de <i>Azotobacter</i> sp	56
18. Matriz de rechazo de la prueba LSD para comparar las concentraciones de <i>Azotobacter</i> sp	56

ÍNDICE DE FIGURAS

1. Diferenciación celular de <i>Anabaena</i> sp.....	16
2. Relaciones intercelulares entre células vegetativas y heterocistos.....	16
3. Intercambio de compuestos en la simbiosis entre cianobacterias y plantas hospederas	17
4. Ubicación del lugar donde se realizó el muestreo para obtener la cepa de <i>Anabaena</i> sp.....	24
5. Lugar donde se realizó el muestreo de agua superficial para obtener la cepa de <i>Anabaena</i> sp.....	25
6. Muestra de agua del colegio cercano al humedal de Guaymaral	25
7. Vista macroscópica de <i>Anabaena</i> sp. en caja de Petri	26
8. Vista microscópica de <i>Anabaena</i> sp.....	26
9. Tubo de <i>Anabaena</i> sp. en medio semisólido	27
10. Botellas de <i>Anabaena</i> sp. en shaker refrigerado	28
11. Botellas agitadas de 2 litros de <i>Anabaena</i> sp. en medio BG11(0).....	29
12. Montaje realizado para elaborar la curva de crecimiento.....	29
13. 500 ml de cada una de las concentraciones de <i>Anabaena</i> sp.....	30
14. Curva de biomasa vs absorbancia a 550nm de <i>Anabaena</i> sp.....	31
15. Diferenciación de las cepas de <i>Nostoc</i> sp. y <i>Anabaena</i> sp	32
16. Botellas de 2 L de <i>Nostoc</i> sp en medio BG11(0)	33
17. 500 ml de cada una de las concentraciones de <i>Nostoc</i> sp	33
18. Curva de crecimiento de <i>Nostoc</i> sp	34
19. Cepa de <i>Azotobacter</i> sp. en caja de Petri y solución madre.....	35
20. 5 tubos de 49,5 ml de cada una de las concentraciones de <i>Azotobacter</i> sp ...	36
21. 10 Tubos de soluciones del Patrón de Mc Farland.....	37
22. Presencia de hongo al inocular <i>Anabaena</i> sp. en el medio MS.....	38
23. Plántulas de yuca muriendo en peat moss, luego de inocular <i>Anabaena</i> sp ...	39
24. Procedimiento utilizado para preparar las 200 plántulas para el bioensayo	40
25. Plántulas para pesar al inicio de los tratamientos	42
26. Lugar donde se realizaron los tratamientos y se mantuvieron las plántulas	42

27. Método de inoculación de las microalgas	43
28. Unidad experimental	44
29. Diseño de dos factores completamente al azar	45
30. Dispersión del porcentaje de crecimiento de los datos de la concentración 1 de <i>Anabaena</i> sp. con respecto al peso final	46
31. Promedio aritmético del porcentaje de crecimiento de las plántulas de menta para cada una de las fuentes de nitrógeno y para el testigo absoluto	49
32. Crecimiento porcentual promedio de las plántulas inoculadas con las 5 concentraciones de <i>Anabaena</i> sp.....	52
33. Crecimiento porcentual promedio de las plántulas inoculadas con las 5 concentraciones de <i>Nostoc</i> sp.....	53
34. Crecimiento porcentual promedio de las plántulas inoculadas con las 5 concentraciones de <i>Azotobacter</i> sp.....	55
35. Crecimiento porcentual promedio de las plántulas inoculadas con las concentraciones con mejor rendimiento de cada fuente de nitrógeno	57

RESUMEN

La producción más limpia en el sector agrícola se ha venido convirtiendo en una alternativa económicamente viable, y una de sus aplicaciones es el uso de las biotecnologías dentro de las cuales los biofertilizantes resultan ser muy novedosos dadas las tendencias globales relacionadas con el cuidado de los recursos ambientales utilizando productos biodegradables. Para la presente investigación se evaluó el valor biológico de las cianobacterias *Nostoc* sp. y *Anabaena* sp. como biofertilizantes inoculando plántulas de menta (*Mentha spicata*) bajo condiciones controladas en el laboratorio. Inicialmente se realizó el aislamiento y la multiplicación de las cepas que fueron colectadas en humedales de la Sabana de Bogotá. Se lograron establecer las curvas de crecimiento de cepas nativas de *Nostoc* sp. y *Anabaena* sp. lo que permitió conocer la concentración de microalgas que se utilizaron en la inoculación de las plántulas.

Para cada una de las cepas de microalgas, se establecieron 5 concentraciones diferentes con las cuales se inocularon plántulas de menta con el fin de evaluar su potencial como biofertilizantes. El patrón de comparación fue una cepa comercial de *Azotobacter* sp. (el testigo relativo) así como con plántulas sin microorganismos inoculados (testigo absoluto).

Se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre las cepas evaluadas, siendo *Azotobacter* sp. la de mayor crecimiento. Ninguna de las dos cepas aisladas en esta investigación mostró un efecto positivo en el crecimiento de las plántulas bajo las condiciones experimentales utilizadas.

Palabras claves: *Anabaena* sp, *Azotobacter* sp, *Nostoc* sp, microalgas, biofertilizante, cianobacterias, *Mentha spicata*.

1. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Se estima que los cultivos agrícolas proporcionan más del 84% de los alimentos del mundo [1], es por esto que resulta de vital importancia pensar en el uso de tecnologías y estrategias de Producción Más Limpia en empresas agricultoras que deseen minimizar sus impactos al ambiente y maximizar su producción, aportando en la solución a la problemática de la pobreza y el hambre, lo cual atiende el primero de los 8 Objetivos de Desarrollo del Milenio que es "erradicar la pobreza extrema y el hambre" [2].

Actualmente se usan una gran cantidad de agroquímicos (fertilizantes químicos) que permiten aumentar la productividad y erradicar las plagas. Se calcula que a partir del año 2012 hasta el año 2020 en América Latina, la producción y el consumo de agroquímicos crecerá en un 33% [3]; por lo que se hace urgente la implementación de alternativas limpias de producción. Una alternativa es el uso de los biofertilizantes, los cuales aumentan el rendimiento de los cultivos y mejoran la producción de alimentos sin generar afectaciones al medio ambiente; caso contrario al del uso de fertilizantes químicos [1].

Los biofertilizantes son insumos formulados con uno o varios microorganismos, los cuales proveen o mejoran la disponibilidad de nutrientes cuando se aplican a los cultivos. Esta tecnología trae como ventaja una mayor producción de los cultivos a bajo costo, la protección del ambiente y la conservación del suelo desde el punto de vista de fertilidad y biodiversidad [4], lo cual concuerda con el séptimo de los objetivos del milenio, fijados por los miembros de las Naciones Unidas, que es "garantizar la sostenibilidad ambiental" [5].

Para la presente investigación se propone la evaluación del valor biológico de dos especies de microalgas (*Nostoc* sp. y *Anabaena* sp. del orden de las Nostocales) como biofertilizantes en el cultivo de la menta; con el propósito de encontrar una alternativa biológica que permita suplir la demanda de nitrógeno en los cultivos, reduciendo así el impacto ambiental que causa el uso excesivo de fertilizantes químicos en los suelos del país.

2. MARCO TEÓRICO

2.1 Importancia del nitrógeno como elemento de fertilización

Existen dos categorías de nutrientes del suelo, los micronutrientes y los macronutrientes. Los micronutrientes o microelementos, son aquellos que las plantas necesitan en pequeñas cantidades para su crecimiento; entre estos se encuentran el hierro, el zinc, el manganeso, el cobre, el molibdeno, el cloro y el boro [6]. Los macronutrientes son aquellos que se requieren en grandes cantidades. Si el suelo es pobre en nutrientes se debe aplicar una gran cantidad de macronutrientes, ya que de estos depende el rendimiento del cultivo.

Los macronutrientes se dividen en primarios y secundarios. Los primarios son el nitrógeno, el fósforo y el potasio. Los secundarios son el magnesio, el azufre y el calcio. El Nitrógeno (N) es el nutriente principal para el crecimiento de las plantas ya que suple de 1 a 4% del extracto seco de la planta. El nitrógeno puede ser absorbido en forma de nitrato (NO_3^-) o de amonio (NH_4^+); en la planta se combina con componentes producidos por el metabolismo de carbohidratos para formar aminoácidos y proteínas. Siendo el constituyente esencial de las proteínas, está involucrado en todos los procesos principales de desarrollo de las plantas; un buen suministro de nitrógeno para la planta es importante también por la absorción de los otros nutrientes [6].

2.2 Importancia de los fertilizantes nitrogenados

Los fertilizantes nitrogenados son sustancias nutritivas que en su composición química tienen nitrógeno en forma asimilable para la planta, es decir que cuando son aplicados al suelo o a las hojas, pueden ser absorbidos por los diferentes órganos, contribuyendo así a su crecimiento, desarrollo y producción [7].

Existe actualmente una generalizada deficiencia de nitrógeno en los suelos a nivel mundial, lo que implica una dependencia directa entre el uso de estos productos y los rendimientos, especialmente en cultivos altamente especializados y transgénicos [7].

Es difícil estimar exactamente la contribución de los fertilizantes minerales al aumento de la producción agrícola, debido a la interacción de muchos otros factores importantes. Los fertilizantes continuarán jugando un papel decisivo en el desarrollo agrícola, esto sin tener en cuenta cuáles tecnologías nuevas puedan surgir. Se

estima que, a escala mundial, aproximadamente el 40 por ciento (del 37 por ciento al 43 por ciento) del suministro proteínico de la dieta a mediados de la década de los noventa tuvo su origen en el nitrógeno sintético producido por el proceso Haber-Bosch para la síntesis de amoníaco [6]. Este proceso se logra mediante la reacción directa entre el nitrógeno y el hidrógeno presentes en una atmósfera controlada bajo condiciones de alta presión (300 atmósferas) y temperatura (500°C). De acuerdo con la International Fertilizer Industry Association (IFA), del 100% de la producción mundial de amoníaco en el año 2011, tan solo el 6,3% fue producido en Latinoamérica; y en cuanto al consumo, en Latinoamérica se consumió el 3,3% [7].

Los principales fertilizantes nitrogenados sólidos que se derivan del amoníaco son la urea, el sulfato de amonio y el nitrato de amonio. La urea es el de mayor utilización por su alta concentración de nitrógeno (46%) y su bajo costo [7].

Para el caso puntual de Colombia, según la IFA, en 2010 Colombia importó 80.000 toneladas de estos productos de países como Rusia, Ucrania y algunos de Latinoamérica como Venezuela y Trinidad y Tobago; además se ha evidenciado que aproximadamente el 80% de los productores agrícolas hacen aplicaciones de fertilizantes nitrogenados, de los cuales el más empleado es la urea. El uso de éstos se ha venido incrementando con el tiempo, registrándose para 1990 aplicaciones de 100 kg/ha y en el 2001 alrededor de 250 kg/ha de urea. Con lo anterior se evidencia la importancia que ha cobrado el uso de fertilizantes nitrogenados para el desarrollo y sostenimiento de los diferentes cultivos a nivel nacional, ya que una aplicación con los procesos técnicos adecuados puede resultar en aumentos de rendimientos, calidad y rentabilidad económica de los cultivos [7].

2.3 Impactos ambientales de la fertilización por nitrógeno

El problema ambiental más importante relativo al ciclo del N, es la acumulación de nitratos en el subsuelo que por lixiviación pueden incorporarse a las aguas subterráneas, o bien ser arrastrados hacia los cauces y reservorios superficiales. En estos medios los nitratos también actúan de fertilizantes de la vegetación acuática, de tal manera que si se concentran, puede originarse la eutrofización del medio. En un medio eutrofizado, se produce la proliferación de especies como algas y otras plantas verdes que cubren la superficie. Esto trae como consecuencia un elevado consumo de oxígeno y su reducción en el medio acuático, así mismo dificulta la incidencia de la radiación solar por debajo de la superficie. Estos dos fenómenos producen una disminución de la capacidad auto depuradora del medio y un déficit en la capacidad fotosintética de los organismos acuáticos [8].

2.4 Los biofertilizantes

Un biofertilizante, es un fertilizante orgánico natural que ayuda a proporcionar a las plantas todos los nutrientes que necesitan y a mejorar la calidad del suelo, creando un entorno microbiológico natural [9].

Los biofertilizantes y bioestimuladores representan un componente vital de los sistemas agrícolas sustentables, constituyendo un medio económicamente atractivo y ecológicamente aceptable, permitiendo reducir los insumos externos y mejorar la cantidad y calidad de los recursos internos, mediante la utilización de microorganismos del suelo debidamente seleccionados, capaces de aportar a los cultivos el nitrógeno fijado de la atmósfera, fósforo transformado a partir del que está fijado en el suelo y sustancias fisiológicamente activas, que al interactuar con la planta, promueven una mayor activación del metabolismo [10].

2.5 Uso de bacterias como biofertilizantes

Las bacterias promotoras de crecimiento en plantas (BPCP) son un grupo de diferentes especies de bacterias que pueden incrementar el crecimiento y productividad vegetal. Entre los organismos más conocidos están las especies pertenecientes a los géneros *Rhizobium*, *Pseudomonas*, y *Azospirillum*. Las BPCP pueden clasificarse en dos grupos: (i) Bacterias promotoras de crecimiento en plantas, donde la bacteria afecta a las plantas suprimiendo otros microorganismos. Los mecanismos que estas bacterias utilizan pueden ser a través de su propio metabolismo (solubilizando fosfatos, produciendo hormonas o fijando nitrógeno), afectando directamente el metabolismo de la planta (incrementando la toma de agua y minerales), mejorando el desarrollo radicular, incrementando la actividad enzimática de la planta o “ayudando” a otros microorganismos benéficos para que actúen de mejor manera sobre las plantas. (ii) Bacterias promotoras de crecimiento en plantas con capacidad de control biológico, las cuales promueven el crecimiento de la planta al suprimir los fitopatógenos [11].

El uso de bacterias del género *Azotobacter* en la agricultura es muy amplio, y ya se utilizan preparados especiales como biofertilizantes en grandes cultivos de cereales, obteniendo excelentes resultados en el aporte de nitrógeno para las plantas [12], por lo que esta bacteria sirve de patrón comparativo frente a otros microorganismos [13].

2.5.1 Taxonomía de *Azotobacter* sp.

Existen varios tipos de microorganismos que habitan fundamentalmente en el suelo y tienen la capacidad de fijar nitrógeno aeróbicamente. El género *Azotobacter* (ver anexo 1) perteneciente al Filo *Proteobacteria*, comprende un grupo de especies de bacilos grandes, Gram negativos, aerobios estrictos y fijadores de nitrógeno atmosférico (N₂) sin establecer simbiosis con las plantas.

Las células de *Azotobacter* son grandes, tienen diámetros entre 2 y 4 µm o incluso más. Algunas estirpes son móviles por flagelos peritricos. En medios con carbohidratos, se forman grandes cápsulas y capas mucoides. A pesar de que *Azotobacter* es un aerobio estricto, su nitrogenasa (enzima que cataliza la fijación biológica del N₂) es muy sensible al O₂. Se piensa que el material capsular y mucoso protegen a esta enzima del efecto inactivante del O₂. Todos sus miembros fijan nitrógeno, pero pueden utilizar también formas combinadas simples tales como amoníaco, urea o nitrato [14]. *Azotobacter* tiene formas de resistencia denominadas *cistos*, los cuales tienen un índice de respiración muy bajo y son resistentes a la desecación, desintegración mecánica y radiaciones ultravioleta e ionizantes. Sin embargo, no son particularmente resistentes a la temperatura y no están completamente en reposo porque oxidan rápidamente fuentes exógenas de energía [14].

2.5.2 Las cianobacterias y su uso como biofertilizantes

Las cianobacterias son organismos fotosintéticos oxigénicos. Representan una división del reino *Bacteria* y tienen una relación filogenética lejana con las bacterias *Gram positivas* [14]. Existe una amplia diversidad de cianobacterias. Se conocen formas unicelulares y filamentosas. En el presente proyecto se trabajó con dos géneros del orden de las Nostocales que forman filamentos y producen heterocistos: *Anabaena* sp. (ver anexo 2) y *Nostoc* sp. (ver anexo 3).

Muchas cianobacterias filamentosas son capaces de llevar a cabo procesos de diferenciación celular (como las pertenecientes a los géneros *Anabaena* y *Nostoc*) entre los cuales están la formación de acinetos, hormogonios y heterocistos. Los acinetos son células que se desarrollan como formas de resistencia en circunstancias ambientales adversas. Los hormogonios son filamentos móviles que juegan un papel en la dispersión de la estirpe. Los heterocistos son células especializadas en la fijación del nitrógeno atmosférico (N₂) que se forma en ausencia de fuente de nitrógeno combinado en el medio externo [15] (ver figura 1).

Las células vegetativas realizan la fotosíntesis y producen esqueletos carbonados que deben ser transferidos en parte al heterocisto. El heterocisto por su parte fija el nitrógeno atmosférico, produciendo amonio (NH_4^+) el cual se incorpora a esqueletos carbonados para dar lugar a aminoácidos que son transferidos a las células vegetativas (ver figura 2).

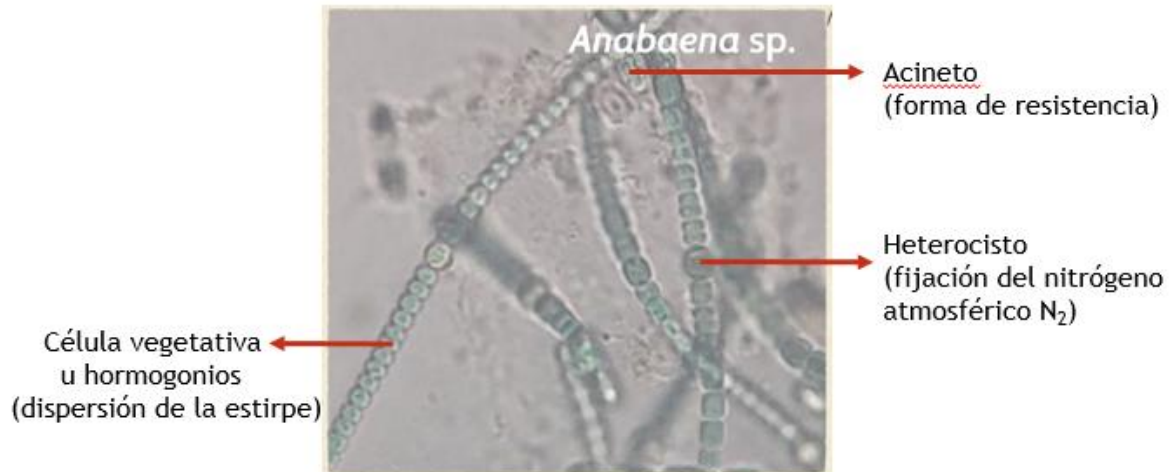


Figura No. 1 Diferenciación celular de *Anabaena sp.*

La distribución de heterocistos en el filamento no es aleatoria, sino que existe un patrón de desarrollo de heterocistos a lo largo del filamento. Se desconoce con certeza el mecanismo molecular que establece dicho patrón, aunque existen algunos modelos teóricos que se han propuesto [15].

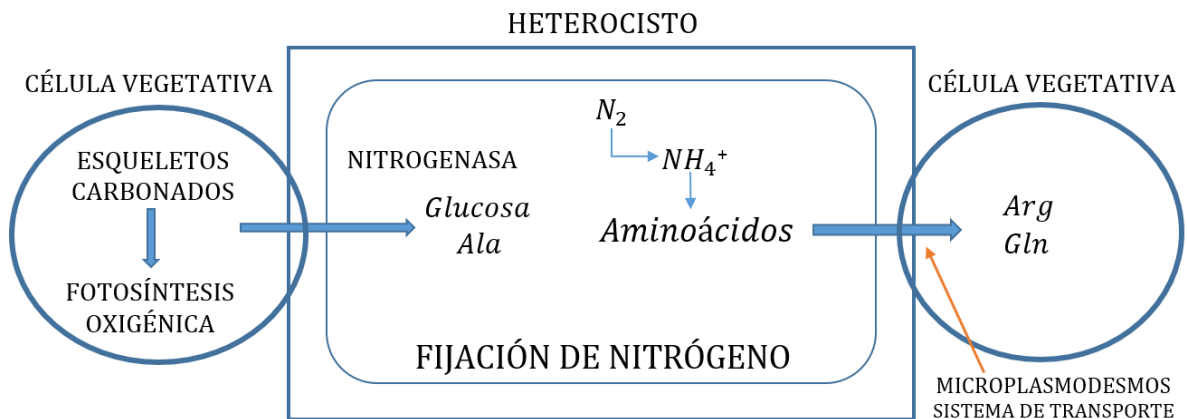


Figura No. 2 Relaciones intercelulares entre células vegetativas y heterocistos.

Fuente: Adaptado de [15].

La fijación y transferencia de nitrógeno desde el cianobionte (cianobacteria simbiótica) al hospedero ocurre en todas las simbiosis, siendo los heterocistos, los

sitios de fijación y de las primeras reacciones de asimilación. El N puede existir en las células en las formas NH_4^+ (amonio) o NH_3 (amoníaco) que puede difundir a través de las membranas o ser reciclado por las células a través de un sistema transportador de amonio, devolviéndolo desde el espacio periplásmico conjuntamente con un protón. El transporte de nitrógeno desde los tejidos simbióticos hacia las otras partes del hospedero se hace en forma de aminoácidos [16].

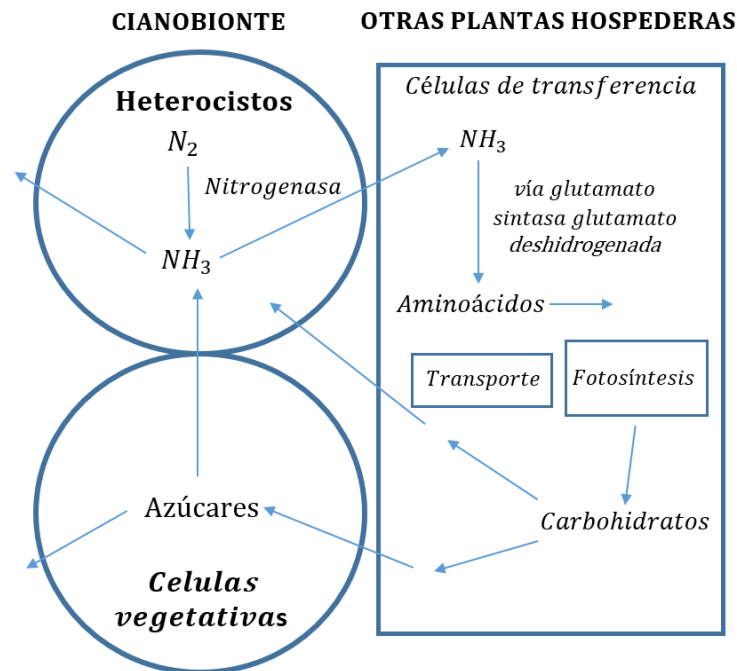


Figura No. 3 Intercambio de compuestos en la simbiosis entre cianobacterias y plantas hospederas.

Fuente: Adaptado de [16].

El proceso de conversión del nitrógeno gaseoso en productos mayormente disponibles y asimilables se desarrolla por la acción de microorganismos presentes en el suelo, algunos de ellos como *Azospirillum*, *Azotobacter*, *Beijerinckia* (microorganismos que establecen asociaciones rizocenóticas con plantas gramíneas), *Rhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Azorhizobium* (bacterias que establecen simbiosis con leguminosas), *Frankia* (actinomicetos simbióticos con plantas leñosas), *Nostoc* (microalgas cianofíceas que establecen simbiosis con diversas plantas) o con *Anabaena* (que establecen simbiosis con helechos) [17].

Un ejemplo de esto, fue el desarrollado por Bocchi y Malgioglio quienes emplearon la asociación helecho acuático-cianobacteria acuática *Azolla-Anabaena* como

fertilizante en cultivos de arroz del norte de Italia. Esta simbiosis ha sido empleada con frecuencia en cultivos de arroz en diferentes regiones del mundo, especialmente en Asia. Para hacer seguimiento del proceso, se evaluó la dinámica de crecimiento de las plantas, la resistencia/tolerancia frente a bajas temperaturas y presencia de herbicidas en el sustrato. La investigación permitió obtener producciones de nitrógeno cercanas a 40 Kg/Ha, en un período de tres meses, y verificar incrementos en la tasa de crecimiento del arroz [17].

Otro ejemplo, relaciona a *Nostoc* con su potencial como biofertilizante en Sudáfrica, donde se hizo una investigación sobre suelos degradados, para mejorar los rendimientos en cultivos. Aquí se incorporaron 6 g de *Nostoc*/m² de suelo antes de sembrar maíz. Los resultados sugieren que se mejora la fertilidad y mejora la estabilidad estructural del suelo degradado; además estos resultados sugieren que mediante el uso de cianobacterias, el rendimiento y el valor nutricional de los cultivos podrían mejorarse sin necesidad de usar fertilizantes costosos [18].

También existen estudios que involucran preparados con varias cepas de microalgas, como es el desarrollado en la India. En este estudio se realizó un biofertilizante con cepas de *Nostoc* sp., *Anabaena doliolum*, *Calothrix* sp., *Westiellopsis* sp. y *Phormidium papyraceum*. Los resultados sugieren que el aporte de nitrógeno de este biofertilizante, aumentó el crecimiento de las plántulas de arroz (*Oryza sativa* L.) y que combinándolo con otros fertilizantes comerciales puede resultar siendo una alternativa económicamente viable [19].

2.5.2.1 *Anabaena* sp. y *Nostoc* sp. como biofertilizantes en Colombia

En la Sabana de Bogotá, la eutrofización es una de las consecuencias de los procesos de contaminación de las aguas en ríos y humedales, que pueden ser provocados por un exceso de nutrientes en el agua, principalmente nitrógeno y fósforo, permitiendo el crecimiento excesivo de especies vegetales, que al encontrarse en gran cantidad y después de cumplido su ciclo de vida, mueren y se degradan [20]. Es por esto que resulta necesario incrementar y difundir ampliamente aquellas investigaciones que se realizan en Colombia, y que demuestren que existen diferentes alternativas como los biofertilizantes, que ayudan a solucionar el problema de la eutrofización y de la disponibilidad de nutrientes para las plantas.

Aunque existen estudios en otros países, como el desarrollado a *Azolla-Anabaena* en el cultivo del arroz en el norte de Italia, y otras que relacionan el uso de *Azotobacter* sp. y *Spirullina* sp.; en Colombia se está comenzando a investigar el

tema de los biofertilizantes y en especial el tema del uso de las microalgas como aplicaciones en diferentes campos. Resulta novedosa tanto la investigación como la aplicación, de los géneros *Nostoc* y *Anabaena* (especies locales) para biofertilización en los suelos del país.

Las especies de microalgas más utilizadas en los estudios realizados en el Laboratorio de cultivo de algas, de la Universidad Nacional de Colombia, son *Chlorella vulgaris* y *Scenedesmus ovalternus*, las cuales se usan para estudios ambientales de contaminantes presentes en suelos y aguas, proyectos de producción de alimentos, la producción de productos de valor agregado, entre otros [21]; siendo estas investigaciones diferentes al tema de biofertilización propuesto por el Grupo de Investigación "Procesos y Soluciones Energéticas".

Las algas ocupan el primer eslabón de la cadena alimenticia en el ambiente acuático, ya que son productores primarios capaces de elaborar sustancias orgánicas a partir de sustancias inorgánicas, transformando la energía luminosa que proviene del sol en energía química y son buenas para fijar CO₂ y N₂. En este campo, también la información es muy poca en Colombia [22].

En el campo de la producción de biocombustibles en Colombia se han realizado diversas investigaciones con microalgas, como es el caso de la investigación realizada en la Universidad Nacional, donde se concluyó inicialmente que las microalgas podrían llegar a jugar un papel económico muy importante para el país, debido a su potencial de generación de biocombustibles [23]. La sola idea de encontrar una solución a la crisis energética estimuló en todo el mundo las investigaciones relacionadas con microalgas. Hoy en día, aunque no se descarta que esta pueda ser una línea de producción interesante, la realidad demuestra que la productividad algal con estos fines no se ha logrado. Lo positivo de esto se refleja en otros frentes que surgieron alrededor de estos microorganismos como son los productos químicos derivados de ellas. Ejemplos de ellos son los usos en la fabricación de aceites atractivos para la fabricación de cosméticos y la producción de suplementos alimenticios para humanos y mascotas debido al alto porcentaje de proteína que contienen las microalgas en su biomasa.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo general

Evaluar el valor de *Nostoc* sp. y *Anabaena* sp. como biofertilizantes fijadores de nitrógeno en plántulas de menta (*Mentha spicata*).

3.2 Objetivos específicos

- Desarrollar una metodología para aislar una nueva cepa de *Anabaena* sp.¹.
- Multiplicar las cepas de microalgas fijadoras de nitrógeno en medios de cultivo apropiados para alcanzar una reproducción masiva.
- Desarrollar una metodología para estimar la concentración de las microalgas en suspensión.
- Desarrollar una metodología de bioensayo para determinar el efecto de las diferentes fuentes biológicas de nitrógeno, sobre el crecimiento de plántulas de menta.
- Comparar la eficiencia de distintas concentraciones de *Nostoc* sp. y *Anabaena* sp., como biofertilizantes frente al género *Azotobacter* sp.

¹ La cepa de *Nostoc* sp. utilizada en este ensayo ya había sido aislada previamente en el laboratorio de investigación de la Universidad Central y la cepa de *Azotobacter* sp. proviene del fertilizante comercial Agroplux.

4. JUSTIFICACIÓN

El rol del ingeniero ambiental en la sociedad es muy amplio. Como cualquier ingeniero, el ambiental tiene como función la solución a los problemas ambientales de manera integrada, es decir, teniendo en cuenta los distintos factores ambientales, sociales y económicos, aplicando las distintas herramientas que la tecnología y el conocimiento le permite, con el fin de promover el desarrollo sostenible.

La Facultad de Ingeniería Ambiental de la Universidad Santo Tomás, expresa como propósito en su misión el "*formar profesionales competentes en el desarrollo y administración de proyectos compatibles con la conservación de los recursos naturales, en la identificación de problemáticas ambientales y en la formulación de alternativas de solución; con visión para proyectar socialmente las acciones de conciliación entre los componentes del sistema natural y las actividades económicas, de forma tal que se conviertan en profesionales indispensables para el mantenimiento y mejoramiento de la calidad de vida del ser humano*". Para la presente investigación se ha identificado una problemática ambiental relacionada con el uso de los fertilizantes químicos y el problema de la eutrofización por nitrógeno, tanto en aguas como en suelos; para esto se propone la evaluación de una alternativa de solución planteada en laboratorio: el uso de *Anabaena* sp. y *Nostoc* sp. como biofertilizantes.

Una aplicación de la ingeniería ambiental muy importante es el uso de "Tecnologías limpias", las cuales tienen como fin reducir el impacto ambiental generado por el hombre. Dentro de las llamadas tecnologías limpias se pueden encontrar las "biotecnologías" las cuales consisten en aplicar y aprovechar las interacciones biológicas con el fin de desarrollar productos nuevos o solucionar una problemática.

Los biofertilizantes son hoy en día una alternativa biotecnológica para alcanzar una agricultura sostenible. Debido a que el estudio de las microalgas está comenzando a nivel nacional, hay pocos centros de investigación en este tema. La presente investigación brindará nuevo conocimiento sobre el potencial de las microalgas como biofertilizantes, resaltando la importancia de que se trabajó con plántulas de fácil propagación en el clima frío de Bogotá (*Mentha spicata*) y con microalgas propias de la Sabana de Bogotá, lo cual resulta muy interesante ya que se genera tanto información básica como aplicada de microorganismos que se encuentran en esta región del país.

5. DELIMITACIÓN

En esta investigación se utilizaron especies locales de cianobacterias. La cepa de *Nostoc* sp. fue aislada a partir de muestras de agua del humedal Santa María del Lago, la cepa de *Anabaena* sp. de aguas cercanas al humedal "Guaymaral"; y la cepa perteneciente al género *Azotobacter* sp. fue donada por la empresa de flores *Elite*, extraída del biofertilizante comercial Agropflux.

La investigación que se presenta en este documento únicamente incluye la fase preliminar de campo (para el aislamiento y multiplicación de las cepas) y su posterior evaluación en condiciones de laboratorio para determinar el potencial o el valor biológico que tienen estas bacterias para fertilización. El análisis que se presenta para la evaluación de las cianobacterias como biofertilizantes, se realizó con 200 plántulas de menta (*Mentha spicata*), también conocidas como "hierbabuena" provenientes del Centro de Biosistemas de la Universidad Jorge Tadeo Lozano que fueron sembradas y mantenidas en condiciones controladas en los laboratorios de investigación de la Universidad Central.

6. METODOLOGÍA

Para la obtención de la cepa de *Nostoc* sp. y *Anabaena* sp. se procedió a tomar muestras de humedales pertenecientes a la Sabana de Bogotá. Estas muestras se recolectaron y se almacenaron a temperatura ambiente en el laboratorio de investigaciones de Ciencias Naturales de la Universidad Central, en botellas plásticas transparentes para facilitar la supervivencia de los organismos presentes en ellas. La cepa de *Azotobacter* sp. fue obtenida del fertilizante comercial Agroflux, y sólo se procedió a multiplicarla, mientras que las plántulas de menta fueron obtenidas del Centro de Biosistemas de la Universidad Jorge Tadeo Lozano y propagadas en el laboratorio.

Inicialmente se realizó el aislamiento y la identificación de cada una de las cepas a inocular para evaluar su potencial como biofertilizantes. Para la cianobacteria *Nostoc* sp. se siguió el protocolo “Isolation, Culture, and Laboratory Maintenance of Colombian cyanobacteria *Nostoc* sp. and *Anabaena* sp.” donde se explica el procedimiento utilizado por el Grupo de Procesos & Soluciones Energéticas para aislar y reproducir masivamente esta cepa en medio líquido sin nitrógeno. El protocolo para la obtención de la cepa de *Anabaena* sp. se explica a continuación.

6.1 Protocolo para la identificación y cultivo monoespecífico de *Anabaena* sp. a partir de muestras tomadas en el humedal de Guaymaral

El procedimiento propuesto en el laboratorio para aislar y cultivar *Anabaena* sp. así como su futura utilización como biofertilizante tuvo tres pasos:

- ✓ Aislamiento e identificación de la cepa.
- ✓ Reproducción en medio sólido y líquido.
- ✓ Preparación de las soluciones a inocular a partir de la curva de crecimiento.

6.1.1 Aislamiento e identificación de la cepa

El muestreo fue realizado en un lago cercano al Colegio Gimnasio La Montaña, perteneciente al humedal de Guaymaral al norte de la ciudad de Bogotá. Se escogió este lugar de muestra al observar una coloración verde en el agua ya que no se cuenta con mucha información sobre distribuciones poblacionales de estos géneros en particular en la Sabana de Bogotá. Por lo tanto el criterio fue buscar “blooms” (o grandes cantidades de algas) que suelen aparecer en ciertas épocas del año por razones que no se han podido determinar con claridad, pero que deben estar

relacionadas con la disponibilidad de nutrientes o con cambios de temperatura ambiental. Se conocía que el color de los blooms de *Anabaena* sp. es verde azulado, de ahí su nombre de cianobacterias, por lo tanto con esta información se hizo la búsqueda preliminar [24]. Al observar en el cuerpo de agua las floraciones de algas verde-azuladas, se procedió a tomar la muestra de agua superficial.

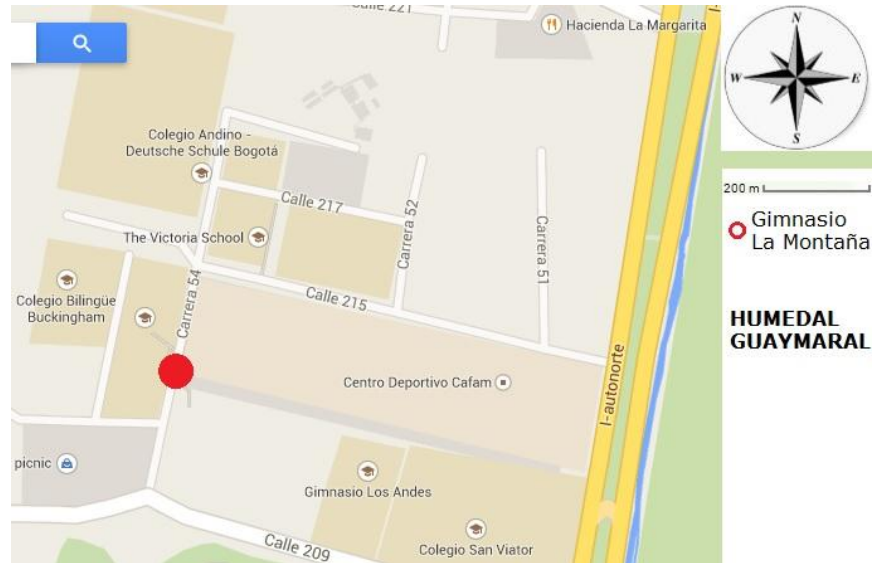


Figura No. 4 Ubicación del lugar donde se realizó el muestreo para obtener la cepa de *Anabaena* sp.

Fuente: Adaptado de [25].



Figura No. 5 Lugar donde se realizó el muestreo de agua superficial para obtener la cepa de *Anabaena* sp.

Fuente: Adaptado de [26].



Figura No. 6 Muestra de agua del colegio cercano al humedal de Guaymaral.

Se tomaron 300 ml de agua superficial y se concentró la muestra debido a que estos microorganismos viven en grupos heterogéneos, esto se hizo centrifugando la muestra en 6 tubos a 3.500 rpm. El pellet obtenido se sembró en cajas de Petri con medio de cultivo BBM sólido (Bold's Basal Medium) (ver anexo 4) el cual carece de vitaminas y contiene algunas concentraciones de metales traza, siendo muy útil para muchas algas [27]). Finalmente se realizaron pases de las colonias verde-azules con asas de bacteriología en la cabina de flujo laminar:

Se tomaron muestras de las colonias y se sembraron con la técnica del rayado a cajas nuevas con medio BBM sólido. Semanalmente, se volvió a tomar una muestra y se sembró en caja de Petri con medio BBM sólido. Al cabo de 4 semanas (4 pases) se obtuvo únicamente el crecimiento de colonias verdes y las cajas contaminadas (con bacterias de otro color) se desecharon. Todos estos pases se realizaron a temperatura ambiente.

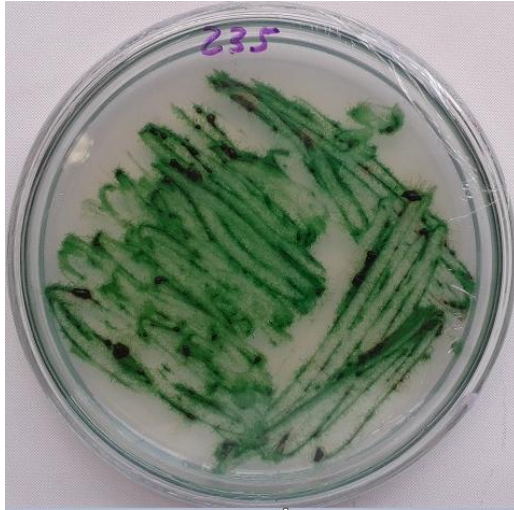


Figura No. 7 Vista macroscópica de *Anabaena* sp. en caja de Petri.

Mediante la técnica del rayado se logró aislar la cepa de *Anabaena* sp., a partir de la cual se hicieron pases a medio BG11 sólido (medio selectivo para este tipo de cianobacterias) (ver anexo 5). Posteriormente se logró la reproducción en medio BG11(0) sólido, medio de cultivo sin fuente de nitrógeno (ver anexo 6) donde se garantizaba que las cianobacterias sobrevivientes tuvieran la capacidad de fijar nitrógeno atmosférico por lo cual en este momento servirían para producirlas a gran escala.

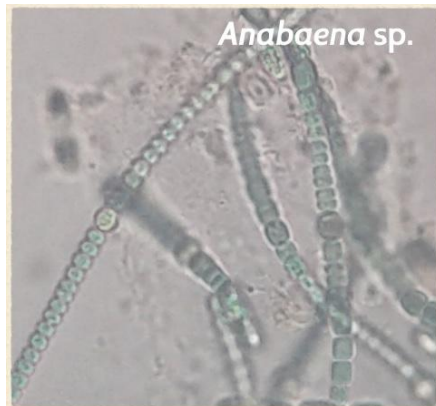


Figura No. 8 Vista microscópica de *Anabaena* sp.

Finalmente se obtuvo la cepa aislada de *Anabaena* sp., que fue identificada por el Biólogo Freddy Augusto Duque Duque, Taxónomo de macroalgas y cianobacterias de la Universidad Nacional de Colombia.

Uno de los criterios que puede utilizarse para diferenciar *Anabaena* de otras Nostocales es la presencia de mucilago cuando se cultiva en medio sólido. *Anabaena* suele tener poco mucilago y *Nostoc* mucho más. Esto también se pudo corroborar usando el microscopio con ayuda del experto que fue contratado para la identificación de las cianobacterias.

6.1.2 Reproducción en medio semisólido y líquido

Inicialmente se realizaron pases de las colonias aisladas de *Anabaena* sp. a medio semisólido de BG11(0), luego se procedió a adaptar la cepa a medio líquido (BG11-0) bajo condiciones asépticas, realizando pases en la cabina de flujo laminar.

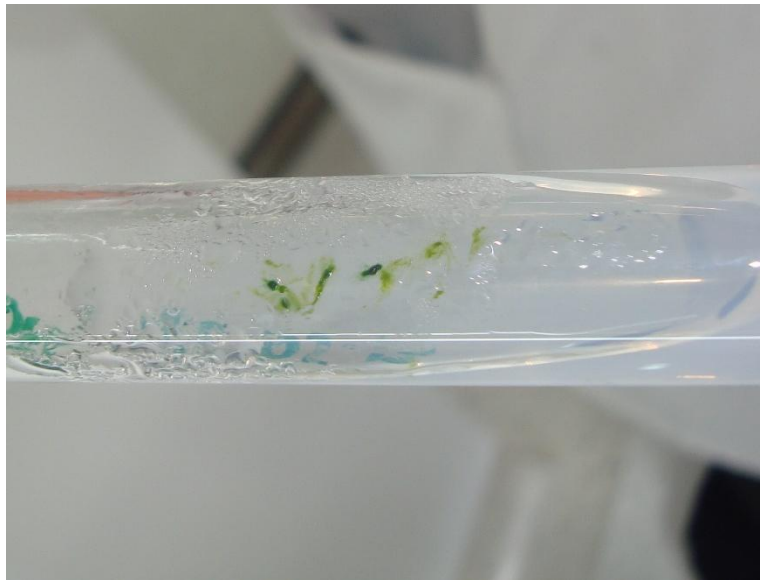


Figura No. 9 Tubo de *Anabaena* sp. en medio semisólido

Luego se realizaron pases de *Anabaena* sp. a medio líquido en 6 tubos de eppendorf de 1,5ml (cada uno con 0,5ml de muestra y 0,5ml de medio BG11-0). Después de 8 días, se mezclaron los 6ml de las muestras en botellas de 300 ml (6ml de muestra y 60ml de medio BG11-0) y se conservaron las estas cianobacterias en un shaker refrigerado (de la marca Thermo Scientific modelo MaxQ 4450) con fotoperiodo 12:12, a 26°C y 74 rpm.



Figura No. 10 Botellas de *Anabaena* sp. en shaker refrigerado.

Como se puede ver en la figura anterior, hubo algunas botellas que tenían una coloración diferente (marrón), como es el caso de la botella resaltada; estas microalgas se desecharon y sólo se conservaron aquellas con coloración verde-azul.

Finalmente se pudo multiplicar a *Anabaena* sp., hasta llegar a una cantidad de 200 ml de cianobacterias y a estas se les agregaron 1.800 ml de medio BG11(0) líquido. Según las metodologías consultadas, las cianobacterias deben irse cultivando de forma escalonada. Se cree que estos organismos prefieren vivir en grandes grupos lo cual promueve su reproducción de forma relativamente rápida [28].

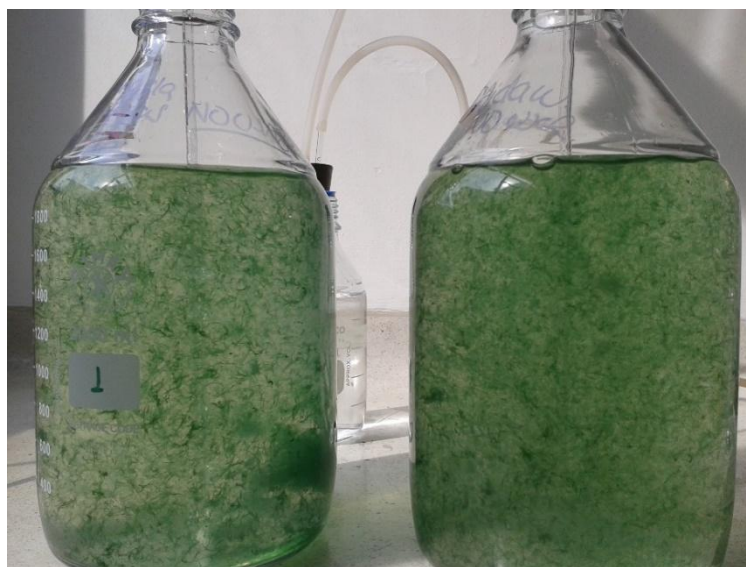


Figura No. 11 Botellas agitadas de 2 litros de *Anabaena* sp. en medio BG11(0).

6.1.3 Preparación de las soluciones de *Anabaena* sp. a inocular en las plántulas, a partir de la curva de crecimiento

Se realizó un montaje para agitar y oxigenar el medio de cultivo con los inóculos de cianobacterias utilizando aire estéril. El montaje a su vez requirió de la elaboración de una caja de leds (ver anexo 9) con la cual, se controlaron las condiciones de luminosidad (10.000 lux) y se ajustó un fotoperiodo 16:8 [29]. Los leds tienen la ventaja de no generar calor lo cual en este caso resulta indispensable por tratarse de organismos vivos.



Figura No. 12 Montaje realizado para elaborar la curva de crecimiento.

El aire se bombeó con el ratón y se pasó por una solución de hipoclorito comercial al 5% y tres botellas de agua, con el fin de agitar constantemente las microalgas y evitar así que se aglomeraran. Las botellas de agua se usaron para eliminar el exceso de cloro debido a que el cloro mata las bacterias.

Para determinar las concentraciones algales, se usó un espectrofotómetro marca Thermo Scientific; serie Génesis 10 u.v. de rango visible ya que era necesario determinar la concentración de las cianobacterias en la parte final del trabajo.

Aunque se trató de contar las microalgas al microscopio, esto no se pudo porque ellas son filamentosas y por lo tanto usar la cámara de Neubauer es inexacto; posteriormente se trató de cuantificar las bacterias con un contador de células automático, pero esto tampoco se pudo realizar porque son mucilaginosas, es por esto que bajo estas condiciones se procedió a tomar 5 valores distintos de absorbancia (1,2; 1,0; 0,8; 0,6 y 0,4) realizando diluciones en el medio BG11(0) líquido, para establecer las diferentes concentraciones de las soluciones a inocular en las plántulas.



Figura No. 13 500 ml de cada una de las concentraciones de *Anabaena sp.*

Para el cálculo de las concentraciones fue necesario utilizar la siguiente curva de crecimiento de *Anabaena sp.* (biomasa vs absorbancia) realizada en el laboratorio:

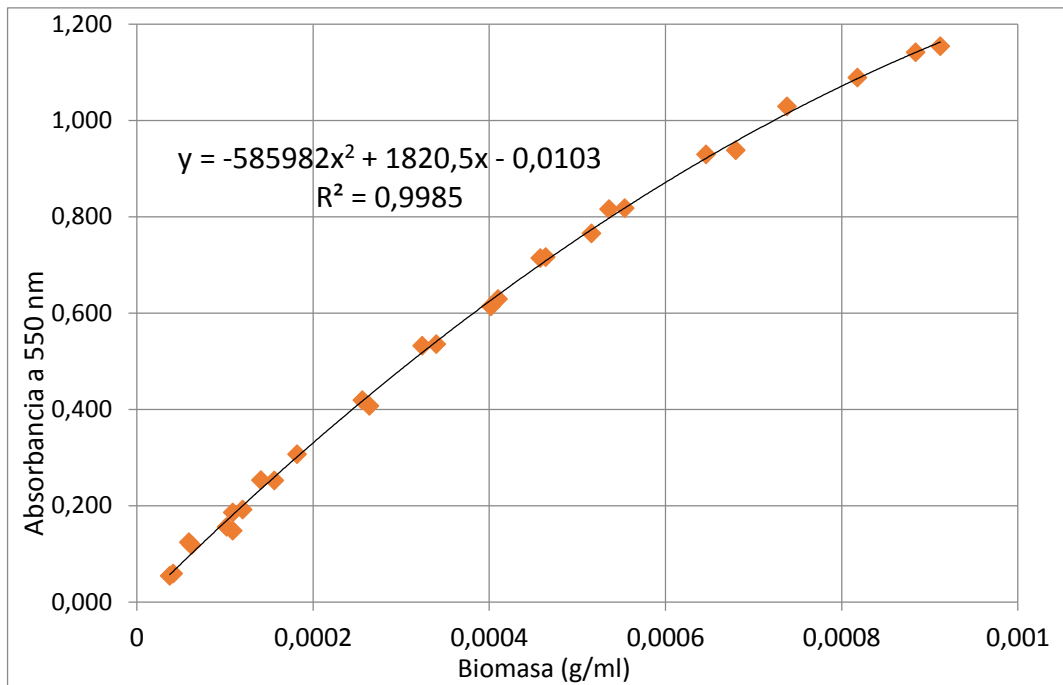


Figura No. 14 Curva de biomasa vs absorbancia a 550nm de *Anabaena* sp.
Fuente: [30].

Utilizando la ecuación de la gráfica de absorbancia a 550nm vs biomasa (g/ml), se determinaron las diferentes concentraciones a las cuales se inocularon las plántulas. Como esta ecuación está en términos de Y (absorbancia), se procedió a despejarla en términos de X (biomasa) con el software web Wolfram Alpha, dando como resultado:

$$x = 0,00155338 - (8,53269 * 10^{-7} \sqrt{(3,29008 * 10^6 - 2,34393 * 10^6 y)})$$

Con esta ecuación (ecuación inversa) se pudieron hallar los valores de Biomasa con respecto a los valores de absorbancia ya conocidos, reemplazando el valor de Y (absorbancia) en la ecuación; de esta forma se determinaron las 5 diferentes concentraciones.

Tabla No. 1 Biomasa de cada concentración de *Anabaena* sp.

Concentración	Absorbancia (550nm)	Biomasa (g/ml)
C1	0,454	$2,8034 * 10^{-4}$
C2	0,594	$3,7792 * 10^{-4}$
C3	0,883	$6,1076 * 10^{-4}$
C4	1,07	$7,9879 * 10^{-4}$
C5	1,269	$1,074 * 10^{-3}$

6.2 Reproducción y preparación de las soluciones a inocular de *Nostoc* sp.

La cepa de *Nostoc* sp. que se usó, fue la que ya estaba aislada en el laboratorio. Las cepas de *Nostoc* sp. y *Anabaena* sp. son muy parecidas fisiológicamente al observarlas en el microscopio, es por esto que fue necesario observarlas a 10x para poderlas diferenciar, debido a la formación de mucílago de cada cepa.

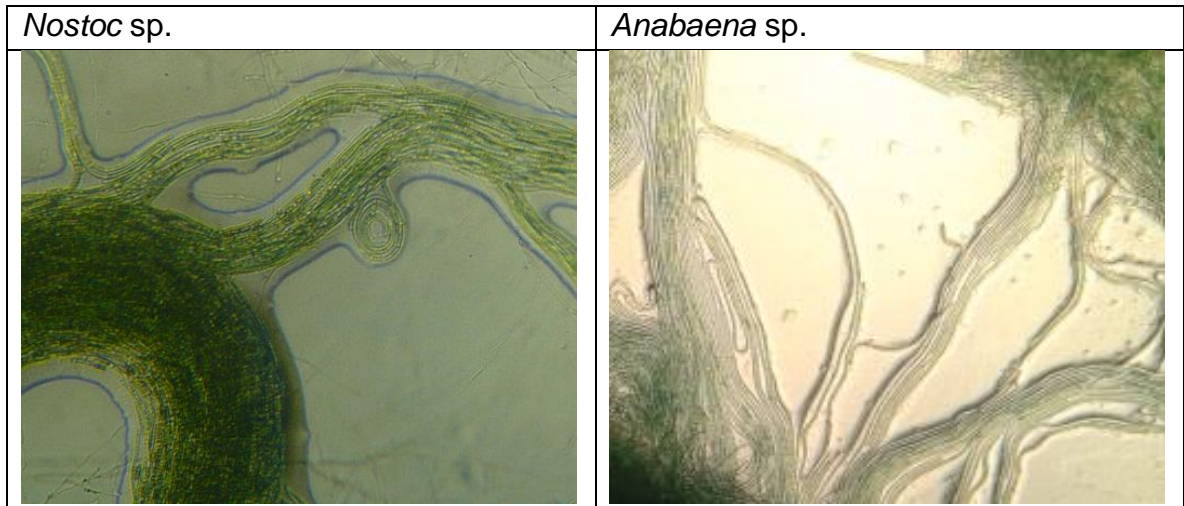


Figura No. 15 Diferenciación de las cepas de *Nostoc* sp. y *Anabaena* sp.

Como se puede observar en la anterior fotografía, la cepa que secreta una capa mayor de mucílago es *Nostoc* sp.

Finalmente, se procedió a reproducir la cepa de *Nostoc* sp. en medio líquido BG11(0) en botellas de 2 litros, utilizando el mismo procedimiento utilizado en la multiplicación de *Anabaena* sp.



Figura No. 16 Botellas de 2 L de *Nostoc* sp en medio BG11(0).

Posteriormente se realizaron las soluciones a inocular, utilizando el mismo procedimiento para preparar las soluciones de *Anabaena* sp.



Figura No. 17 500 ml de cada una de las concentraciones de *Nostoc* sp.

Para el cálculo de las concentraciones fue necesario utilizar la curva de crecimiento realizada en el laboratorio. Se utilizó el mismo procedimiento realizado para el cálculo de la biomasa de *Anabaena* sp.

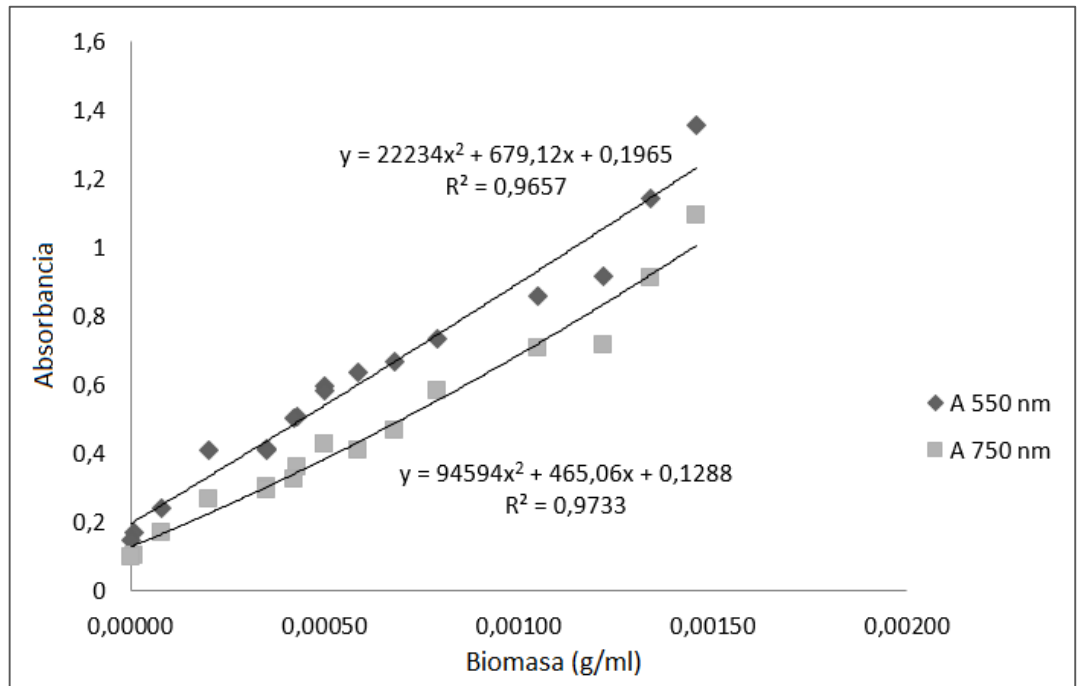


Figura No. 18 Curva de crecimiento de *Nostoc* sp.
Fuente: [31].

Utilizando la siguiente ecuación (ecuación inversa) de la gráfica de absorbancia a 550 nm vs biomasa (g/ml), se determinaron las 5 diferentes concentraciones.

$$x = -0,0152721 + (2,24881 * 10^{-5} \sqrt{(88936y + 443728)})$$

Tabla No. 2 Biomasa de cada concentración de *Nostoc* sp.

Concentración	Absorbancia (550nm)	Biomasa (g/ml)
C1	0,438	$3,5158 * 10^{-4}$
C2	0,667	$6,7779 * 10^{-4}$
C3	0,849	$9,3236 * 10^{-4}$
C4	0,971	$1,10079 * 10^{-3}$
C5	1,251	$1,48096 * 10^{-3}$

6.3 Reproducción y preparación de las soluciones a inocular de *Azotobacter* sp.

Se reprodujo la cepa de *Azotobacter* sp. en medio de cultivo Ashby sólido (ver anexo 7) en cajas de Petri a temperatura de 24° C.



Figura No. 19 Cepa de *Azotobacter* sp. en caja de Petri y solución madre.

De estas cajas se extrajeron las bacterias con asas de bacteriología y se trasladaron a un recipiente de vidrio. Se obtuvo una masa gelatinosa (debido a la capa mucoide que forman) a la cual se le agregó agua destilada y se procedió a revolverla con un asa bacteriológica hasta obtener una solución madre homogénea de 10 mL. Posteriormente, se realizaron diluciones 1:10 en agua destilada para obtener como resultado 5 concentraciones diferentes.

Tabla No. 3 Diluciones de *Azotobacter* sp.

No. Tubo	Agua destilada (ml)	Sol. Madre (ml)	Dilución obtenida	Total (ml)
C5	49,5	5,5	0,1	49,5
C4	49,5	5,5 del tubo C5	0,01	49,5
C3	49,5	5,5 del tubo C4	0,001	49,5
C2	49,5	5,5 del tubo C3	0,0001	49,5
C1	49,5	5,5 del tubo C2	0,00001	49,5



Figura No. 20 5 tubos de 49,5 mL de cada concentración de *Azotobacter sp.*

Para la determinación de la densidad poblacional de cada uno de los tubos de las diluciones de *Azotobacter sp.*, se realizó la metodología del Patrón o Estándar de Mc Farland, el cual consiste en una serie de tubos herméticamente cerrados, previamente calibrados y con una densidad óptica diferente originada por la aparición de un precipitado de sulfato de bario (SO_4Ba) resultante de la reacción entre el cloruro de bario (Cl_2Ba) al 1,175% (0,048 M) y el ácido sulfúrico (H_2SO_4) al 1% (0,36N) (tabla 4). Esta turbidez puede interpretarse ópticamente o por métodos espectrofotométricos y cada una de ellas se corresponde a una concentración conocida de bacterias/ml [32].

Tabla No. 4 Soluciones del Estándar de Mc Farland

Tubo	Cl_2Ba (1,175%)	SO_4H_2 (1%)	u.f.c./ml
1	0,1	9,9	3×10^8
2	0,2	9,8	6×10^8
3	0,3	9,7	9×10^8
4	0,4	9,6	12×10^8
5	0,5	9,5	15×10^8
6	0,6	9,4	18×10^8
7	0,7	9,3	21×10^8
8	0,8	9,2	24×10^8
9	0,9	9,1	27×10^8
10	1	9	30×10^8

Fuente: [32]



Figura No. 21 10 Tubos de soluciones del Patrón de Mc Farland.

De la solución C5 de *Azotobacter* sp. se tomó 0,5ml de muestra y se diluyó en 2,0ml de agua destilada (esto con el fin de lograr una coloración parecida a alguno de los patrones) dando como resultado una coloración similar a la del tubo 2 del Patrón de Mc Farland (correspondiente a 6×10^8 u.f.c./ml). Finalmente se calculó el valor obtenido de u.f.c. de cada uno de los tubos; siendo la concentración C5 la más alta.

Tabla No. 5 Concentración de bacterias de cada tubo de *Azotobacter* sp.

No. Tubo	Dilución obtenida	(u.f.c./ml)
C1	0,00001	$0,003 \times 10^8$
C2	0,0001	$0,03 \times 10^8$
C3	0,001	$0,3 \times 10^8$
C4	0,01	3×10^8
C5	0,1	30×10^8

6.4 Ensayos preliminares para la evaluación del valor como biofertilizantes de *Anabaena* sp. y *Nostoc* sp.

Al inicio de esta investigación, se tenía pensado realizar los diferentes tratamientos *in vitro*, en clones de plántulas de yuca (*Manihot esculenta*, Euphorbiaceae) provenientes del banco de germoplasma del CIAT (Centro Internacional de Agricultura Tropical) esto con el fin de eliminar gran parte de la variación genética que se puede encontrar en un cultivo; donde además varían las condiciones ambientales en las que tiene que desarrollarse el mismo.

El objetivo era evaluar el valor como biofertilizantes de *Anabaena* sp. y *Nostoc* sp. en estas plántulas y compararlo con la cepa comercial de *Azotobacter* sp. El principal problema fue que al inocular la cepa de *Anabaena* sp. en el medio Murashige & Skoog (MS) (ver anexo 8) se favoreció la reproducción de un hongo presente al parecer en el ambiente del laboratorio.



Figura No. 22 Presencia de hongo al inocular *Anabaena* sp. en el medio MS.

Al observarse la presencia de hongos en todos los tubos inoculados, incluso después de haber analizado la cepa de *Anabaena* sp. en el microscopio, se logró determinar que estos eran hongos presentes en el ambiente. Frente a este problema metodológico se decidió no hacer los ensayos *in vitro* debido a la dificultad de eliminar el crecimiento de hongos saprófitos. Como alternativa se decidió trasladar las plántulas de yuca *in vitro* a bandejas de germinación (de la marca A&P de

Colombia, referencia A-BA72) usando como sustrato turba (materia orgánica de musgo del género *Sphagnum* también conocido como peat moss).

Al sembrar las plántulas de yuca en el peat moss, se pudo observar que estas plántulas comenzaron a morir lentamente, debido a que no se lograron adaptar al cambio de medio de cultivo (de medio MS sólido a la turba). Estas plántulas al estar sembradas en tubos con un medio que les proporcionaba todos los nutrientes necesarios para su supervivencia, no desarrollaron la raíz necesaria, lo que ocasionó que al cambiarlas de medio, se comenzaran a morir.



Figura No. 23 Plántulas de yuca muriendo en peat moss, luego de inocular *Anabaena* sp.

Al cabo de 20 días de haber inoculado las plántulas de yuca con *Anabaena* sp. sólo se encontraban vivas 18 de las 60 en tratamiento, lo que significa una tasa de mortalidad del 70%. Este porcentaje de error no permitía hacer inferencias sobre el efecto de la inoculación como fuente de nitrógeno. Por lo tanto, fue necesario rediseñar completamente el bioensayo.

El nuevo ensayo se realizó en bandejas de germinación con peat moss en donde se reemplazaron las plántulas de yuca por plántulas de menta (*Mentha spicata*) debido a que estas plántulas son muy fáciles de germinar.

6.5 Obtención y propagación del material vegetal utilizado en el bioensayo

Las 200 plántulas de *Mentha* fueron obtenidas del Centro de Bio-Sistemas de la Universidad Jorge Tadeo Lozano. Estas plántulas ya tenían 6 semanas de crecimiento desde su germinación y fueron producidas en un almacigo en invernadero. Para este ensayo las plantas fueron extraídas de la tierra donde estaban sembradas (paso 1) y se cortaron algunos tallos (esquejes) para formar plántulas de uno o dos tallos (paso 2); posteriormente fueron pesadas (peso inicial P_0) con una balanza analítica marca OHAUS Explorer; modelo PIONEER; con una precisión de $\pm 1 \times 10^{-4}$ g. y se sembraron en sustrato turba o peat moss de la marca Pindstrup y adecuadas en bandejas de germinación, las cuales fueron cortadas para disponer las plántulas en grupos de 6 (paso 3).

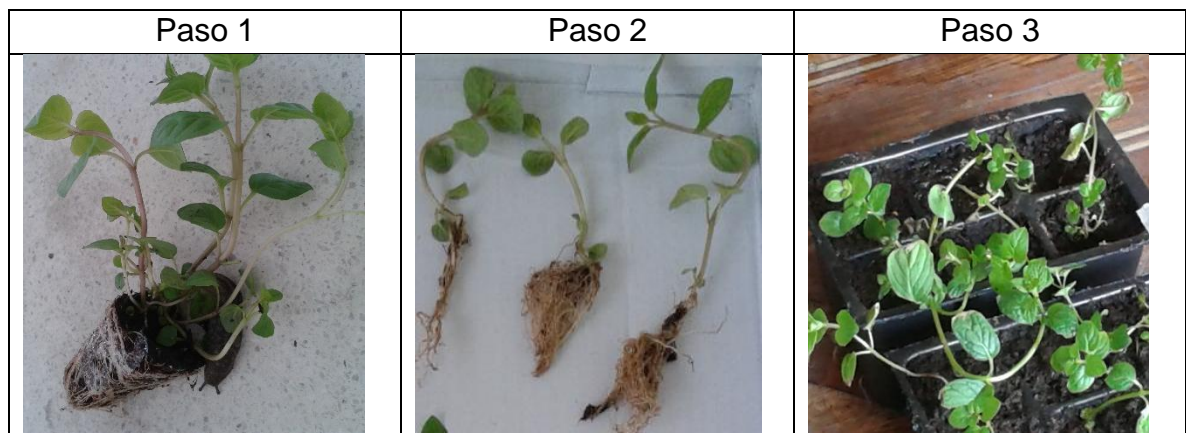


Figura No. 24 Procedimiento utilizado para preparar las 200 plántulas para el bioensayo.

6.6 Diseño experimental

6.6.1 Descripción de los factores, niveles y tratamientos

Para determinar el valor biológico de los géneros de microalgas (cianobacterias) *Anabaena* y *Nostoc* como biofertilizantes, se inocularon distintas concentraciones de microalgas a cultivos de *Mentha spicata*. Estas plantas estuvieron sometidas a condiciones ambientales similares (a temperatura ambiente y riego de 5 ml cada 2 días).

Este experimento implicó un diseño de dos factores, en donde el primer factor es el género de bacteria a inocular (tipo de microorganismo que se añade o fuente de nitrógeno) y sus niveles son: *Azotobacter*, *Anabaena* y *Nostoc*. El segundo factor

fue la concentración de las bacterias inoculadas, con 5 niveles (ver Tabla 6). Por lo tanto se establecieron $(3*5)+1=16$ tratamientos, que incluyen las inoculaciones de las 3 bacterias, cada una en 5 concentraciones, más el testigo, que consistió en agregar el volumen de agua (sin bacterias) que se inoculó en los otros tratamientos.

Tabla No. 6 Tratamientos con los distintos tipos de microorganismos incluidos en el estudio.

	Anabaena	Nostoc	Azotobacter	Sin microorganismo
Concentración 1	1	2	3	16
Concentración 2	4	5	6	
Concentración 3	7	8	9	
Concentración 4	10	11	12	
Concentración 5	13	14	15	
Total de plántulas	60	60	60	20

Se hizo el análisis de los datos usando métodos multivariados. El total de datos a manejar es de $(3*5=15)$ cada uno con 12 réplicas para un total de 180 plántulas inoculadas. La cantidad de plántulas de control o testigo es de 20. El total de plántulas es de 200 (180 de tratamientos más 20 de control).

6.6.2 Descripción de la inoculación

Se inocularon las plántulas cuando tenían 6 semanas de crecimiento y se pesaron al inicio de cada uno de los tratamientos. Es importante aclarar que el muestreo en este caso es un muestreo destructivo, ya que al manipular las plantas, se puede perder biomasa o se puede alterar la plántula al exponer la raíz como se puede ver en la figura 25.



Figura No. 25 Plántulas para pesar al inicio de los tratamientos.

Cinco 5 días después de pesar (peso fresco, P_0) y sembrar las plántulas, se procedió a realizar las inoculaciones (ver tabla 7) en un cuarto especial en el laboratorio (ver figura 25) donde se contaba con una ventana grande para la entrada de la luz, 4 ventanas para ventilación y temperatura ambiente.



Figura No. 26 Lugar donde se realizaron los tratamientos y se mantuvieron las plántulas.

La inoculación, se hizo de igual manera para las microalgas, ya que se prepararon soluciones con valores similares de absorbancia y se inocularon volúmenes iguales en dos días distintos. Como las soluciones de la cepa de *Azotobacter* sp. se cuantificaron con un método distinto, se inoculó un solo día un volumen diferente al de las microalgas, mientras que a las plántulas del testigo o control, se les inoculó un volumen similar al de las microalgas, pero con agua. El método para inocular fue mediante riego, calculando los mililitros inoculados con una probeta, como se puede ver en la figura 26. Las fechas con las cantidades inoculadas se pueden ver en la tabla 7.



Figura No. 27 Método de inoculación de las microalgas.

Tabla No. 7 Fechas de peso inicial, peso final, inoculación 1, inoculación 2 en el bioensayo y cantidades inoculadas.

Fuente de Nitrógeno	Peso inicial (P _o)	Inoculación 1	Cantidad	Inoculación 2	Cantidad	Peso final (P _f)
Anabaena	11-jun	16-jun	10ml	18-jun	6ml	21-jul
Nostoc	13-jun	17-jun	10ml	19-jun	6ml	22-jul
Azotobacter	18-jun	23-jun	4ml	--	--	28-jul
Sin N (agua)	11-jun	16-jun	10ml	18-jun	6ml	21-jul

6.6.3 Unidad experimental

El diseño experimental en este caso tiene como unidad experimental a cada plántula (ver figura 27); para el bioensayo se realizó un diseño de dos factores completamente al azar, donde se dispusieron las bandejas de 6 unidades experimentales de manera aleatoria. Las repeticiones en cada uno de los tratamientos fue la misma, excepto en el caso de las plántulas de control o testigo (sin microorganismo) [33].



Figura No. 28 Unidad experimental

El esquema utilizado para esta investigación fue totalmente aleatorizado, con el fin de evaluar los efectos principales del factor asignado a cada unidad experimental, sin que haya interacciones entre factores. Se rotularon cada una de las bandejas de germinación, con el fin de controlar los distintos tratamientos, por ejemplo, para regarles la misma cantidad de agua a todas las unidades.

NOS3,2	ANA1,1	AZO2,2	NOS1,2	NOS5,2	CON2	ANA3,2	AZO2,1	NOS3,1	AZO4,2	ANA5,1	ANA5,2
ANA4,1	CON1	NOS2,2	AZO3,2	NOS5,1	ANA2,1	CON3	ANA3,1	AZO1,2	ANA4,2	AZO1,1	CON4
	NOS2,1	ANA2,2	ANA1,2	AZO3,1	NOS4,1	AZO4,1	NOS1,1	NOS4,2	AZO5,1	AZO5,2	

Figura No. 29 Diseño de dos factores completamente al azar.

Donde:

- ✓ ANA 1,2: Concentración 1, bandeja 2, cepa de *Anabaena* sp.
- ✓ NOS 5,1: Concentración 5, bandeja 1, cepa de *Nostoc* sp.
- ✓ AZO 3,2: Concentración 3, bandeja 2, cepa de *Azotobacter* sp.
- ✓ CON 4: Bandeja 4 (2 plántulas sin microorganismo o Control).

Las condiciones ambientales del cultivo realizado fueron:

- Temperatura ambiente promedio (14,5°C).
- Fotoperiodo: 12:12 (radiación solar).
- Riego a cada plántula (20 ml el lunes, 20ml el miércoles y 30ml el viernes).
- Humedad relativa: 76%.

6.6.4 Variable de respuesta

Al finalizar el tiempo de crecimiento (5 semanas), se hicieron observaciones cualitativas de la apariencia de las plantas como color de las hojas y apariencia de las raíces. Adicionalmente se calculó la productividad primaria de las plantas sometidas a los distintos tratamientos para lo cual se hizo medidas directas del peso fresco de las plántulas al final de los ensayos [34] [35]. Este peso fresco final (P_f), junto con el inicial (P_i), (medidos en unidades de gramos) permitió que se desarrollara la variable de respuesta, que finalmente es el porcentaje de incremento, el cual sirve para establecer el porcentaje de cambio en el peso de cada una de las plántulas y se calculó de la siguiente manera:

$$\%cambio = \frac{(P_f - P_i)}{P_i} * 100$$

Donde:

Pi: Peso inicial (g)

Pf: Peso final (g)

6.7 Análisis de los datos

El análisis de los datos atípicos se realizó mediante el porcentaje de incremento con respecto al peso final, dado por la fórmula:

$$\%cambio = \frac{(Pf - Pi)}{Pf} * 100$$

Donde:

Pi: Peso inicial (g)

Pf: Peso final (g)

Posteriormente se hizo la observación del gráfico de dispersión y se corroboraron los resultados obtenidos mediante esta fórmula.

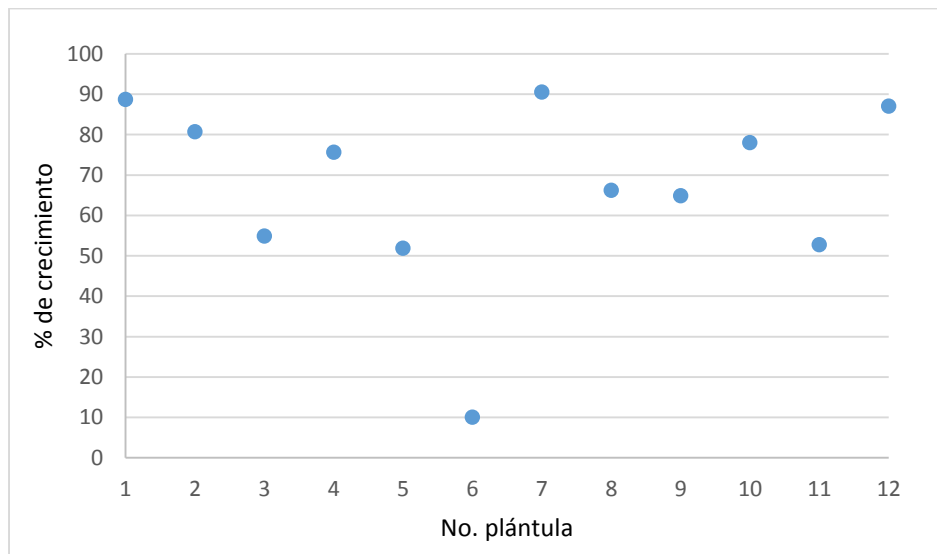


Figura No. 30 Dispersión del porcentaje de crecimiento de los datos de la concentración 1 de *Anabaena* sp. con respecto al peso final.

En este gráfico se puede observar que el valor atípico corresponde a la plántula número 6, teniendo un crecimiento del 10% con respecto al peso final. Este mismo procedimiento se realizó a todas las concentraciones de todos los tratamientos, con el fin de aplicar el análisis estadístico a todos los valores que estuvieron cercanos a la media aritmética.

6.8 Análisis estadístico

Este análisis se aplicará mediante la herramienta ANOVA del software estadístico ProStat Working.

6.8.1 Análisis del efecto principal de los géneros de bacterias y de sus respectivas concentraciones

Para analizar el efecto de la aplicación de *Nostoc*, *Anabaena*, *Azotobacter* y el testigo, y al mismo tiempo ver cuál es el efecto de las cinco concentraciones utilizadas para cada fuente nitrógeno (bacterias), se hizo un análisis de varianza de dos vías. Este análisis permitió distinguir los efectos principales tanto de tipo de bacteria y de concentración, como de la interacción tipo de bacteria-concentración [36]. Por lo tanto se plantearon tres hipótesis estadísticas (hipótesis nulas, H_0):

- ✓ Para el efecto de cada tipo de bacteria la hipótesis nula es: “no existen diferencias estadísticamente significativas en el crecimiento de las plántulas de menta inoculadas con diferentes tipos de bacteria y el testigo”.
- ✓ Para el efecto de la concentración de las inoculaciones la hipótesis nula es: “no existen diferencias estadísticamente significativas en el crecimiento de las plántulas de menta inoculadas con diferentes concentraciones de bacterias”.
- ✓ La hipótesis nula para la interacción es: “no hay un efecto entre, el tipo de bacteria y la concentración a la que se aplica sobre el crecimiento de las plántulas de menta inoculadas”.

Para hacer el análisis de varianza de dos vías se utilizó el programa estadístico Polysoftware Pro-Stat y su opción ANOVA de dos vías.

6.8.2 Análisis de las diferencias entre los géneros de bacteria y el testigo

Para este análisis se usaron los datos del porcentaje de crecimiento de las plántulas para cada una de las bacterias y para el testigo. En este análisis se usaron todos los datos obtenidos independientemente de las concentraciones. Estos datos fueron analizados con un ANOVA de una vía. La hipótesis nula para esta prueba fue que “no existen diferencias estadísticamente significativas en el crecimiento de las plántulas de menta inoculadas con diferentes tipos de bacteria y el testigo”; al obtener una diferencia estadísticamente significativa (se rechazó la H_0 y se acepta la H_a , hipótesis alterna) se procedió a un realizar un análisis de comparación múltiple utilizando la prueba LSD (Least Significant Difference) de Fisher.

6.8.3 Prueba de comparación múltiple de Fisher (LSD) Diferencia Mínima Significativa

El Test LSD (Least Significant Difference) de Fisher es un test de comparaciones múltiples. Permite comparar las medias de las concentraciones, ya que se rechazó la Hipótesis nula (H_0) de igualdad de medias mediante la técnica ANOVA. El Test se basa en la creación de un valor común, un umbral, basado en un test de la t de Student. Se realizan todas las diferencias entre medias de los t niveles. Las diferencias que estén por encima de este umbral indicarán una diferencia de medias significativa y las diferencias que estén por debajo indicarán una diferencia no significativa [37].

ProStat calcula este valor de LSD y a partir de él, calcula todas las diferencias de medias posibles y valoran cuáles están por encima y cuáles están por debajo de este umbral. Así acaba diseñando cuál es el perfil de la Hipótesis alternativa (H_a) elegida mediante el ANOVA previo [37].

7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

7.1 Análisis del efecto principal de los tipos de bacteria y sus concentraciones sobre el crecimiento de las plántulas de menta

Al promediar el porcentaje de crecimiento de las plántulas de menta para cada género de bacteria inoculada y para el testigo, se pueden observar diferencias leves entre los tratamientos (ver figura 31). Las plántulas con mayor crecimiento fueron las que se inocularon con *Azotobacter* sp. proveniente de un fertilizante biológico comercial. Las plántulas inoculadas con *Nostoc* sp. y las del tratamiento testigo no muestran muchas diferencias entre sí y las plántulas inoculadas con *Anabaena* sp. son las que muestran menor porcentaje de crecimiento.

Estas diferencias en el crecimiento de las plántulas pueden ser debidas a que sólo se realizó dos inoculaciones al inicio de los tratamientos; además estos resultados indican que finalmente *Anabaena* no obtuvo un efecto positivo como biofertilizante nitrogenado, lo que sugiere que se profundice en investigar más sobre esta cepa utilizada y sus mecanismos de transformación del nitrógeno, también las toxinas que esta cepa produce, inhibiendo el crecimiento de las plántulas [38] [43].

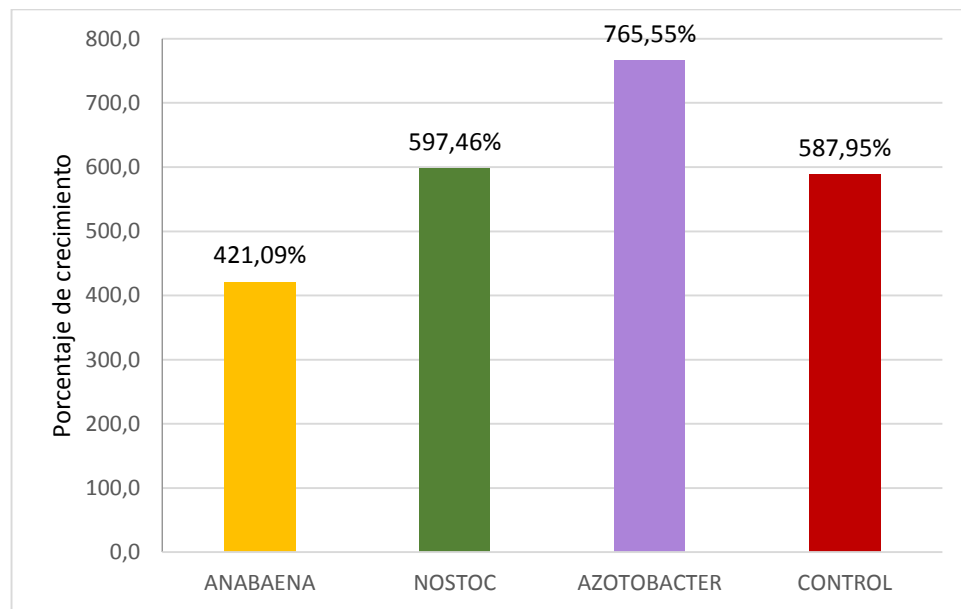


Figura No. 31 Promedio aritmético del porcentaje de crecimiento de las plántulas de menta para cada una de las fuentes de nitrógeno y para el testigo absoluto.

Al analizar estadísticamente estas tendencias con una prueba ANOVA de dos vías se encuentran los estadísticos resumidos en la tabla 8.

Tabla No. 8 ANOVA de dos vías para comparar todos los tratamientos

Fuente	Valor de F	Valor de P
Filas (concentraciones)	2,317	0,059
Columnas (tipos de bacteria o fuentes de N)	5,638	0,001
Interacción (tipo de bacteria vs concentración)	1,812	0,049

- Entre concentraciones: Se rechaza la hipótesis nula (H_0) es decir que sí existe diferencia estadística entre las distintas concentraciones para las diferentes fuentes de nitrógeno. Esto quiere decir que la preparación de las soluciones para cada tipo de bacteria, fue realizada de manera correcta, ya que cada concentración obtuvo un efecto distinto en su valor como biofertilizante.
- Entre tipos de bacterias: Se rechaza la hipótesis nula (H_0) y se acepta la hipótesis alterna (H_a), es decir que sí existen diferencias estadísticamente significativas entre las fuentes de nitrógeno. Esto quiere decir que esta metodología fue viable para evaluar el valor biológico de cada tipo de bacteria, las cuales realizaron cada una, un aporte de nitrógeno diferente.
- Interacción: Este valor de P, quiere decir que sí existe un efecto de la concentración sobre cada fuente de nitrógeno.

7.2 Análisis del efecto de cada una de las fuentes de nitrógeno sobre el crecimiento de las plántulas de menta

Tabla No. 9 ANOVA de una vía para comparar las fuentes de nitrógeno y el testigo absoluto

Fuente	Valor de F	Valor de P
Grupos	4,9362	0,0024

Como el valor de P es 0,0024, se rechaza la hipótesis nula (H_0) y se acepta la hipótesis alterna (H_a), es decir que sí existe diferencia significativa entre las fuentes de nitrógeno y el testigo, entonces se procede a realizar una prueba de comparación múltiple.

7.2.1 Prueba de comparación múltiple de Fisher (LSD) Diferencia Mínima Significativa para comparar las fuentes de nitrógeno

Con esta prueba, se pueden establecer las diferencias estadísticas que existen entre las diferentes fuentes de nitrógeno y el testigo absoluto, como se puede ver en la matriz de rechazo (tabla 11) producto de la matriz de probabilidad (tabla 10).

Tabla No. 10 Matriz de probabilidad de la prueba LSD

	Anabaena	Control	Nostoc
Control	0,057		
Nostoc	0,039	0,868	
Azotobacter	0,000	0,055	0,079

Tabla No. 11 Matriz de rechazo de la prueba LSD

	Anabaena	Control	Nostoc
Control	SÍ		
Nostoc	SÍ	NO	
Azotobacter	SÍ	SÍ	SÍ

Con el resultado de la matriz de probabilidad, se puede deducir que con un nivel de confianza del 90%, sí existe diferencia estadística significativa entre las distintas fuentes de nitrógeno y el testigo absoluto, excepto en uno: 'Nostoc vs Control', ya que al compararlos, ambos obtuvieron como resultado promedios de crecimiento de las plántulas similares: 597,46% para *Nostoc* sp. y 587,95% para Control.

Con esto se puede deducir que el crecimiento de la cepa de *Nostoc* sp. no se puede comparar con el testigo absoluto, no hubo diferencia estadísticamente significativa para realizar inferencias sobre el potencial de *Nostoc* sp. como biofertilizante. Las demás fuentes de nitrógeno y el testigo absoluto sí son comparables estadísticamente.

7.3 Análisis comparativo de cada una de las concentraciones de cada una de las bacterias inoculadas

Para establecer las diferencias estadísticamente significativas entre las distintas concentraciones de bacterias o fuentes de nitrógeno, se hizo un Análisis de Varianza de una vía.

7.3.1 Comparación entre las distintas concentraciones de *Anabaena* sp.

El cambio en el crecimiento de las plántulas inoculadas con las diferentes concentraciones de *Anabaena* sp. no presentaron un comportamiento normal, como se puede ver en la figura 32. Se realizó la prueba del ANOVA de una vía para comprobar las diferencias estadísticas entre las diferentes concentraciones (tabla 12).

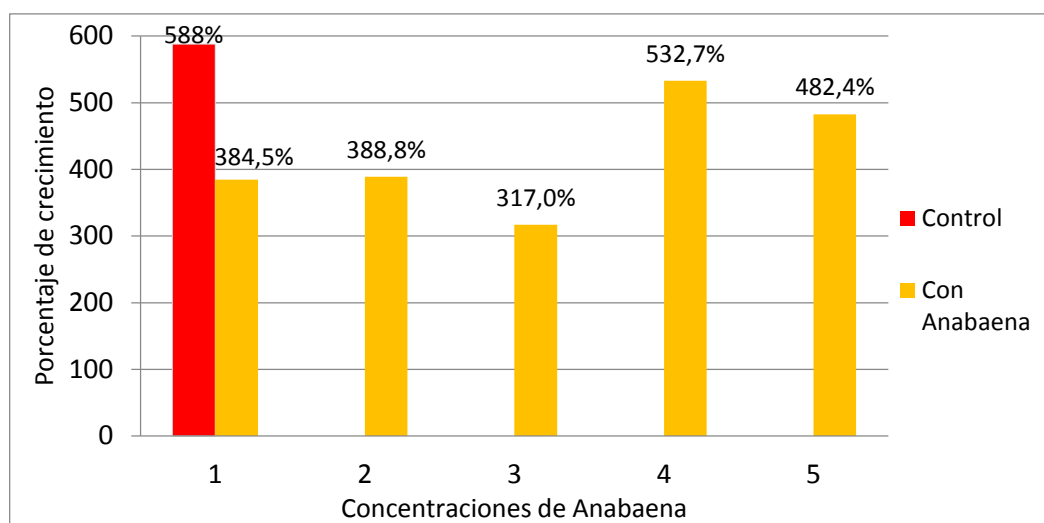


Figura No. 32 Crecimiento porcentual promedio de las plántulas inoculadas con las 5 concentraciones de *Anabaena* sp.

Tabla No. 12 ANOVA de una vía para comparar las concentraciones de *Anabaena* sp.

Fuente	Valor de F	Valor de P
Grupos	0,9294	0,4673

Como el valor de la probabilidad es mucho mayor que alfa (0,1) no se rechaza la H_0 , es decir que no existe diferencia significativa entre las 5 concentraciones inoculadas de *Anabaena* sp., además, no hubo ninguna concentración que obtuviera un resultado positivo en el crecimiento de las plántulas, ya que ninguna superó el valor del testigo o control.

7.3.2 Comparación entre las distintas concentraciones de *Nostoc* sp.

El cambio en el crecimiento de las plántulas inoculadas con las diferentes concentraciones de *Nostoc* sp. presentaron un comportamiento normal, como se puede ver en la figura 33. Se realizó la prueba del ANOVA de una vía para comprobar las diferencias estadísticas entre las diferentes concentraciones (tabla 12).

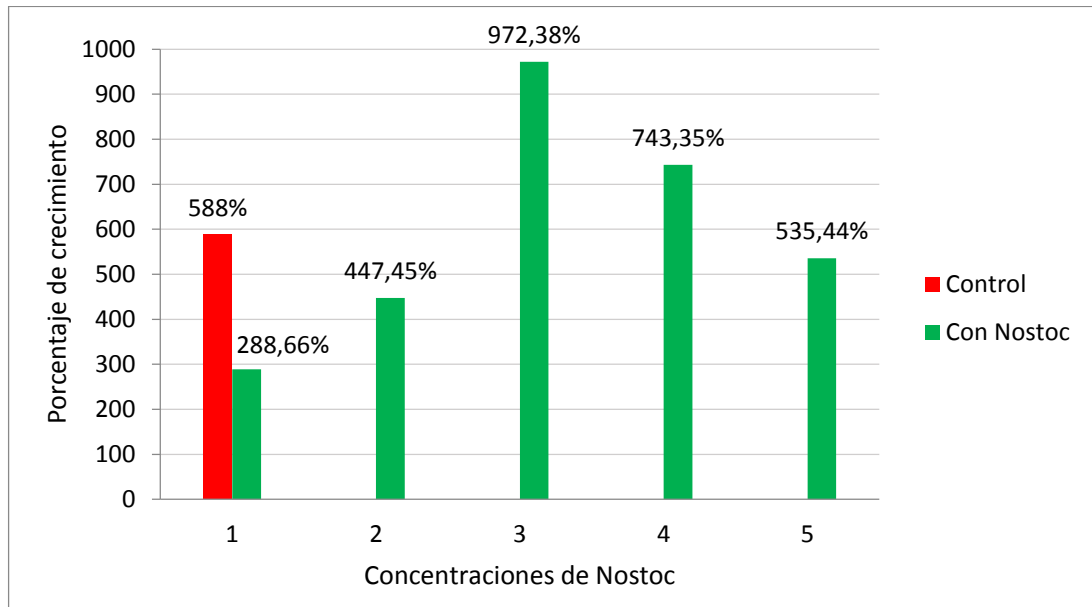


Figura No. 33 Crecimiento porcentual promedio de las plántulas inoculadas con las 5 concentraciones de *Nostoc* sp.

Tabla No. 13 ANOVA de una vía para comparar las concentraciones de *Nostoc* sp.

Fuente	Valor de F	Valor de P
Grupos	3,0412	0,0153

Como el valor de la probabilidad es menor que alfa (0,1), por lo tanto se rechaza la H_0 , es decir que sí existe una diferencia significativa entre las 5 concentraciones inoculadas de *Nostoc* sp. siendo la concentración 3 la que obtuvo el resultado mayor en el crecimiento de las plántulas, a partir de esta, el aporte de nitrógeno fue decreciendo. Como sí existe una diferencia significativa, se procede a realizar una prueba de comparación múltiple.

7.3.2.1 Prueba de comparación múltiple de Fisher (LSD) Mínima Diferencia Significativa para comparar las concentraciones de *Nostoc* sp.

Si se hubieran inoculado todas las plántulas con el tratamiento *Nostoc* sp.- Concentración 3, el resultado total para el crecimiento de plántulas con esta microalga hubiera sido muy positivo, pero este no fue finalmente un resultado destacado, ya que hubo concentraciones que inhibieron el crecimiento de las plántulas.

Tabla No. 14 Matriz de probabilidad de la prueba LSD para comparar las concentraciones de *Nostoc* sp.

	Conc. 1	Conc. 2	Conc. 5	Control	Conc. 4
Conc. 2	0,411				
Conc. 5	0,202	0,632			
Control	0,089	0,393	0,749		
Conc. 4	0,023	0,118	0,270	0,359	
Conc. 3	0,001	0,006	0,022	0,025	0,235

Tabla No. 15 Matriz de rechazo de la prueba LSD para comparar las concentraciones de *Nostoc* sp.

	Conc. 1	Conc. 2	Conc. 5	Control	Conc. 4
Conc. 2	NO				
Conc. 5	NO	NO			
Control	SÍ	NO	NO		
Conc. 4	SÍ	NO	NO	NO	
Conc. 3	SÍ	SÍ	SÍ	SÍ	NO

El resultado de la matriz de rechazo, corrobora los datos observados en la gráfica de comparación de las concentraciones inoculadas de *Nostoc* sp. La concentración que obtuvo un mayor crecimiento porcentual en las plántulas fue la No. 3 con un resultado de 972,38%, seguida por la concentración No. 4 con un valor de 743,35%. Las concentraciones que inhibieron el crecimiento de las plántulas fueron las No. 1, 2 y 5, ya que obtuvieron resultados menores que las plántulas de control.

7.3.3 Comparación entre las distintas concentraciones de *Azotobacter* sp.

El cambio en el crecimiento de las plántulas inoculadas con las diferentes concentraciones de *Azotobacter* sp. no presentaron un comportamiento normal, como se puede ver en la figura 34 Se realizó la prueba del ANOVA de una vía para comprobar las diferencias estadísticas entre las diferentes concentraciones (tabla 16).

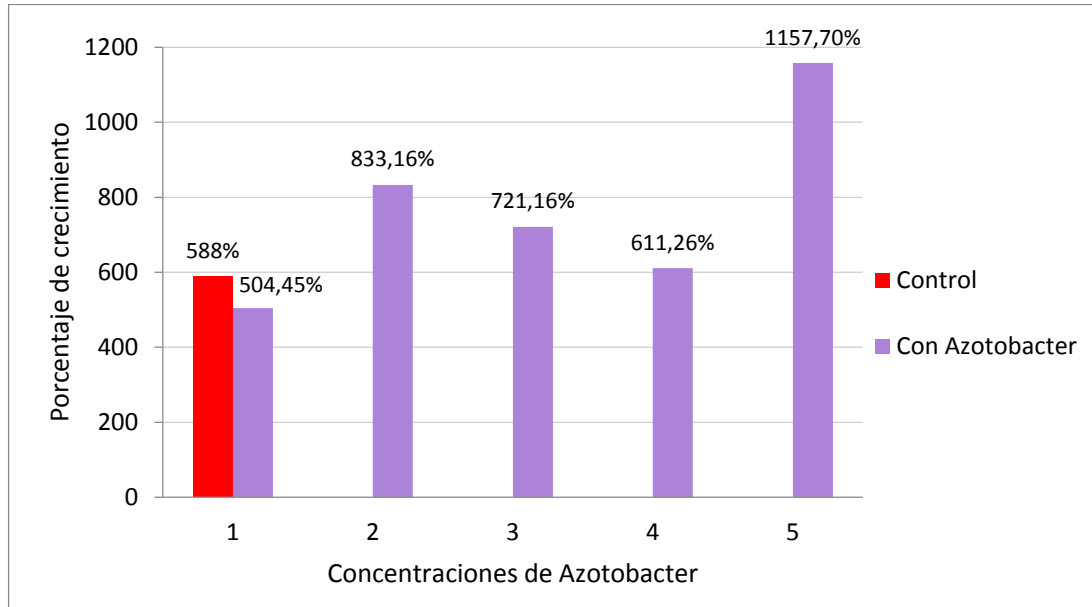


Figura No. 34 Crecimiento porcentual promedio de las plántulas inoculadas con las 5 concentraciones de *Azotobacter* sp.

Tabla No. 16 ANOVA de una vía para comparar las concentraciones de *Azotobacter* sp.

Fuente	Valor de F	Valor de P
Concentraciones	2,9676	0,0174

Como el valor de la probabilidad es menor que alfa, por lo tanto se rechaza la H_0 , es decir que sí existe una diferencia significativa entre las 5 concentraciones inoculadas de *Azotobacter* sp.

7.3.3.1 Prueba de comparación múltiple de Fisher (LSD) Mínima Diferencia Significativa para comparar las concentraciones de *Azotobacter* sp.

Si se hubieran inoculado todas las plántulas con el tratamiento *Azotobacter* sp.- Concentración 5, el resultado total para el crecimiento con *Azotobacter* sp. hubiera sido mucho mayor, pero este resultado no fue tan alto, ya que hubo concentraciones que no se comportaron como la concentración 5 (la más concentrada de bacterias) debido a que se encontraban muy diluidas.

Tabla No. 17: Matriz de probabilidad de la prueba LSD para comparar las concentraciones de *Azotobacter* sp.

	Conc. 1	Control	Conc. 4	Conc. 3	Conc. 2
Control	0,618				
Conc. 4	0,569	0,889			
Conc. 3	0,259	0,440	0,566		
Conc. 2	0,089	0,157	0,248	0,567	
Conc. 5	0,001	0,002	0,007	0,032	0,108

Tabla No. 18: Matriz de rechazo de la prueba LSD para comparar las concentraciones de *Azotobacter* sp.

	Conc. 1	Control	Conc. 4	Conc. 3	Conc. 2
Control	NO				
Conc. 4	NO	NO			
Conc. 3	NO	NO	NO		
Conc. 2	SÍ	NO	NO	NO	
Conc. 5	SÍ	SÍ	SÍ	SÍ	NO

El resultado de la matriz de rechazo, corrobora los datos observados en la gráfica de comparación de las concentraciones inoculadas de *Azotobacter* sp. La concentración que obtuvo un mayor crecimiento porcentual en las plántulas fue la No. 5 con un resultado de 1.157,7%. Las concentraciones No. 2, 3 y 4 tuvieron resultados mayores que las plántulas de control, mientras que la concentración No. 1 tuvo un crecimiento porcentual menor que las plántulas de control.

7.3.4 Comparación entre las concentraciones con los más altos porcentajes de incremento de cada una de las bacterias inoculadas

Al graficar únicamente aquellas concentraciones que obtuvieron un porcentaje de crecimiento mayor que el de las demás dentro de cada fuente de nitrógeno (figura 35) se puede ver que el efecto de Nostoc y Azotobacter como fertilizantes fijadores de nitrógeno puede llegar a ser mucho mejor utilizando estas concentraciones de bacterias, siendo este rendimiento casi el doble de las plántulas de control. Aun así, la concentración con mejor resultado de *Anabaena* sp. no supera al crecimiento que obtuvieron las plántulas de control.

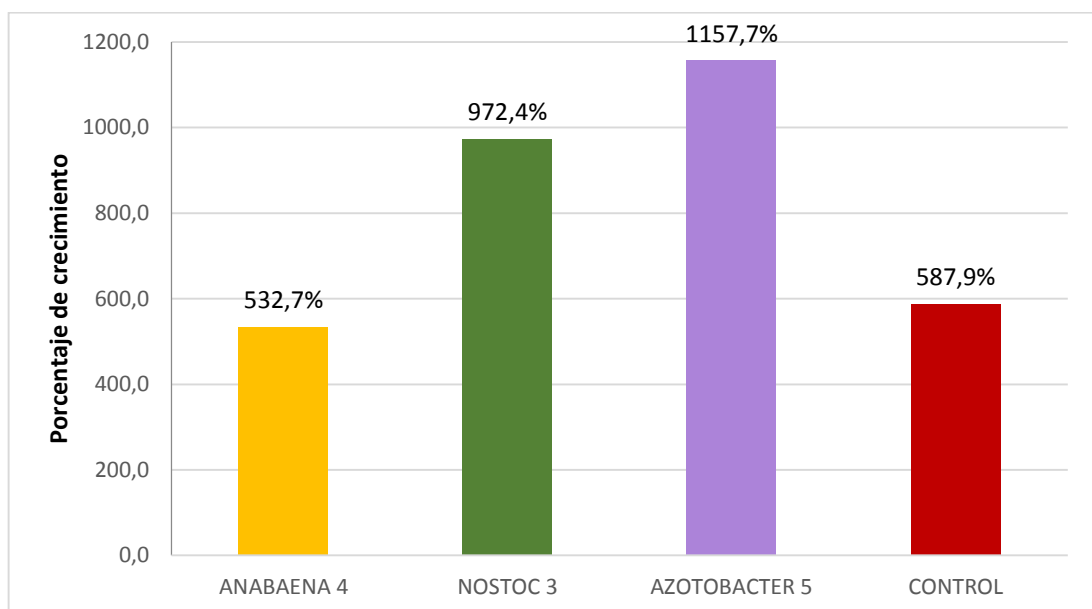


Figura No. 35 Crecimiento porcentual promedio de las plántulas inoculadas con las concentraciones con mejor rendimiento de cada fuente de nitrógeno.

8. CONCLUSIONES

- 1) Se desarrolló una metodología para aislar una nueva cepa de *Anabaena* sp. y multiplicarla, para posteriormente inocularla en diferentes concentraciones a las plántulas de *Mentha spicata* y finalmente poder evaluar su potencial como biofertilizante.
- 2) Se desarrolló una metodología para reproducir *Nostoc* sp. y multiplicarla para inocularla en diferentes concentraciones a las plántulas de *Mentha spicata* y posteriormente evaluar su potencial como biofertilizante.
- 3) Se desarrolló una metodología de bioensayo que permitió determinar el efecto de las diferentes fuentes biológicas de nitrógeno (*Anabaena* sp., *Nostoc* sp. y *Azotobacter* sp.) así como el efecto de cada una de las concentraciones utilizadas de las diferentes fuentes de nitrógeno sobre el crecimiento de las plántulas de menta utilizadas.
- 4) De acuerdo con la metodología propuesta, el valor biológico de *Azotobacter* sp. como biofertilizante fue el mayor entre todas las fuentes de nitrógeno evaluadas en plántulas de menta. El promedio de las plántulas inoculadas con *Nostoc* sp. no muestran un potencial estadísticamente significativo de esta cianobacteria como biofertilizante. Finalmente las plántulas inoculadas con *Anabaena* sp. son las que muestran menor porcentaje de crecimiento.
- 5) Los resultados podrían ser diferentes si se utilizara únicamente la concentración que obtuvo el mejor resultado en cada una de las fuentes de nitrógeno, excepto la utilización de *Anabaena* sp. ya que ninguna de sus concentraciones resultó ser un tratamiento efectivo como biofertilizante.

9. RECOMENDACIONES

- 1) Utilizar otro sustrato diferente a la turba o peat moss, debido a que este sustrato contiene nitrógeno. Aunque la cantidad de sustrato utilizado para cada plántula fue aproximadamente igual, el uso de un sustrato como este podría sesgar los resultados en cierta medida. Para esto, se propone utilizar un sustrato como la arena o las cascarillas de arroz.
- 2) Crear un sistema de riego que garantice que cada plántula obtendrá la misma cantidad de agua, asegurándonos de que el agua utilizada para riego no sea diferente y produzca un sesgo en los resultados ya que en este caso el riego fue manual.
- 3) Tener precaución al inocular las diferentes fuentes de nitrógeno, ya que si no se agitan bien las soluciones, se pueden llegar a inocular diferentes concentraciones dentro del mismo tratamiento, lo que podría alterar el comportamiento de las diferentes plántulas.
- 4) En algunos estudios también se sugiere la fertilización vía foliar y no al sustrato, por lo cual se podría evaluar este aspecto en futuros trabajos.
- 5) La composición molecular de las diferentes cepas de *Anabaena* sp. es diferente: la forma, tamaño de tricomas y las células individuales dentro de un filamento, además de las actividades de las enzimas involucradas en el metabolismo del nitrógeno [38]. Es decir que pueden existir otras cepas de *Anabaena* diferentes a la utilizada en este bioensayo que puedan tener un buen potencial como biofertilizante, como es el caso del aporte de nitrógeno de los cianobiontes de *Azolla-Anabaena* los cuales podrían llegar a ser considerados como un género taxonómico distinto en la familia Nostocaceae [39]. Aquí se sugiere complementar la clasificación taxonómica de las dos cianobacterias conservadas en el laboratorio usando técnicas de biología molecular.
- 6) Se puede contemplar la posibilidad de realizar un mayor número de inoculaciones lo que podría mejorar el rendimiento del crecimiento de las plántulas inoculadas con las cianobacterias.

REFERENCIAS

- [1] ILO & FAO, «Food, Agriculture & Decent Work. ILO & FAO working together.,» 10 2013. [En línea]. Disponible en: <http://www.fao-ilo.org/sectores-agricola/es/>.
- [2] Programa de las Naciones Unidas para el Desarrollo. Colombia., «Objetivos de Desarrollo del Milenio en lo local. 1. Erradicar la pobreza extrema y el hambre.,» [En línea]. Disponible en: www.pnud.org.co. [Último acceso: 10 2013].
- [3] UNEP, «Global Chemicals Outlook report - UNEP. Global report, United Nations Environment Programme,» 2012.
- [4] Acuña, O. «UNEP. CEP, The Caribbean Environment Programme,» [En línea]. Disponible en: <http://cep.unep.org/repcar/capacitacion-y-concienciacion/cenat/biofertilizantes.pdf>. [Último acceso: 09 2013].
- [5] Programa de las Naciones Unidas para el Desarrollo. Colombia., «Objetivos de Desarrollo del Milenio en lo local. 7 Garantizar la sostenibilidad ambiental.,» [En línea]. Disponible en: www.pnud.org.co. [Último acceso: 10 2013].
- [6] Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación, FAO. Asociación Internacional de la Industria de los Fertilizantes, IFA., «Los fertilizantes y su uso,» 2002. [En línea]. Disponible en: <ftp://ftp.fao.org/agl/agll/docs/fertuso.pdf>. [Último acceso: 08 2013].
- [7] DANE, SIPSA, MADR., «Importancia de los fertilizantes nitrogenados.,» 09 2012. [En línea]. Disponible en: https://www.dane.gov.co/files/investigaciones/agropecuario/sipsa/insumos_factores_de_produccion_septiembre_2012.pdf. [Último acceso: 10 2013].
- [8] Martínez, F. *et al.*, «El exceso de nitratos: un problema actual en la agricultura,» *Synthesis. Aventuras del pensamiento.*, vol. 57, 2011.
- [9] FAO, «Organic Agriculture. Glosario de agricultura orgánica.,» 10 2009. [En línea]. Disponible en: <http://www.fao.org/organicag/en/>. [Último acceso: 07 2014].

- [10] Lopez, M. *et al.* «Efecto de biofertilizantes bacterianos sobre el crecimiento de un cultivar de maíz en dos suelos contrastantes venezolanos.,» *Agronomía Tropical*, vol. 58, nº 4, pp. 391-401, 2008.
- [11] Ferrera, R. *Microbiología agrícola. Hongos, bacterias, micro y macrofauna, control biológico y planta-microorganismo*, Trillas de Colombia, 2007.
- [12] Egas, J., *Efecto de la inoculación con Azotobacter sp. en el crecimiento de plantas injertadas de cacao.*, Quito: Escuela Politécnica Nacional, 2010.
- [13] Molina, D.B. *et al* «Producción de un biofertilizante a partir de un aislamiento de *Azotobacter nigricans* obtenido en un cultivo de *Stevia rebaudiana* Bert.,» *Universitas Scientiarum*, vol. 14, nº 1, pp. 71-78, 06 2009.
- [14] M. T. Madigan, J. M. Martinko y J. Parker, de *Brock, Biología de los Microorganismos.*, Décima ed., Illinois, Pearson Prentice Hall, 2003.
- [15] Gutierrez, M.L. *et al.* «Transporte de aminoácidos en cianobacterias,» *Avances en el metabolismo del nitrógeno: de la Fisiología a la Biología molecular: IV Reunión Nacional, Marbella.*, pp. 73-80, 04 1997.
- [16] Figueroa, J.M. «Fijación biológica de nitrógeno,» *Revista UDO Agrícola, Universidad de Oriente, Estado Monagas, Venezuela*, vol. 4, nº 1, pp. 1-20, 2004.
- [17] Carvajal, J. y Mera, A. «Fertilización biológica: técnicas de vanguardia para el desarrollo agrícola sostenible.,» *Producción + Limpia*, vol. 5, nº 2, pp. 77-96, 12 2010.
- [18] Maqubela, M.P. *et al*«*Nostoc* cyanobacterial inoculation in South African agricultural soils enhances soil structure, fertility, and maize growth,» *Springer Science + Business Media B.V.*, vol. 10, nº 1007, 2008.
- [19] Tripathi, R. *et al.* «Role of blue green algae biofertilizer in ameliorating the nitrogen demand and fly-ash stress to the growth and yield of rice (*Oryza sativa* L.) plants,» *Elsevier*, nº 70, 2007.
- [20] Panesso, L. F. M. «Reflexión sobre el estado actual de la cuenca del Río Bogotá,» *Fundación Humedales Bogotá*, 02 2012. [En línea]. Disponible en:

<http://humedalesbogota.com/2012/02/28/reflexion-sobre-el-estado-actual-de-la-cuenca-del-rio-bogota/>.

- [21] Universidad Nacional de Colombia sede Bogotá, «Laboratorio de cultivo de algas,» [En línea]. Disponible en: <http://www.ciencias.unal.edu.co/laun/?itpad=0&niv=0&itact=3218&ti=false&de p=83>. [Último acceso: 11 2013].
- [22] Universidad Nacional de la Patagonia San Juan Bosco, «Función de las algas en la naturaleza,» [En línea]. Disponible en: <http://www.unp.edu.ar/museovirtual/Algasmarinas/GROL.HTM>. [Último acceso: 11 2013].
- [23] Guzmán, C. A. P. «Microalgas, otra opción para producir biocombustible,» Universidad Nacional de Colombia. UN Periódico. Microalgas, otra opción para producir biocombustible., 04 2010. [En línea]. Disponible en: <http://www.unperiodico.unal.edu.co/dper/article/microalgas-otra-opcion-para-producir-biocombustible.html>.
- [24] Leon, L. D. «Floraciones algales de agua dulce: cianobacterias, cianotoxinas. Su relación con la salud,» *Universidad de la Republica Uruguay. Sección Limnología, Instituto de Biología, Facultad De Ciencias.*, 2002.
- [25] Google, «Google Maps,» 2014. [En línea]. Disponible en: <https://www.google.es/maps/place/Bogot%C3%A1,+Colombia/@4.7912099,-74.0453191,16z/data=!4m2!3m1!1s0x8e3f9bfd2da6cb29:0x239d635520a33914>. [Último acceso: 10 2013].
- [26] Google, «Google Earth,» 2014. [En línea]. Disponible en: https://www.google.es/maps/@4.7910889,-74.0477452,3a,75y,279.88h,68.33t/data=!3m4!1e1!3m2!1sNa_O5Z7rStiKFhgP9JV4IA!2e0. [Último acceso: 10 2013].
- [27] B. & B. 1. Bold 1949, «Bold's Basal Medium (BBM),» de *Algal Culturing Techniques*, West Boothbay Harbor, Elsevier Academic Press, 2005, p. 437.
- [28] «Escuela internacional: Biodiversidad, Cambio Climático y Desarrollo.,» de *Módulo 1: Algas y Musgos. Usos de la Biodiversidad y Cambio Climático.*, Del 6 al 9 de julio de 2010.

- [29] Morales, A.V.W. *et al* «Efecto de la intensidad lumínica y fotoperiodo sobre la dinámica y crecimiento poblacional de *Chlorella* sp en medio BBM.,» *Juriquilla, Querétaro*, 19 al 24 de junio de 2011.
- [30] Silva, C. *Separación de la cianobacteria Anabaena sp. por electrocoagulación*, Bogotá: Universidad Santo Tomás, 2014.
- [31] Polanía, D. *Evaluación de las variables del proceso de electrocoagulación para la cosecha de la microalga Nostoc sp. a nivel laboratorio*, Bogotá: Universidad De América, 2014.
- [32] Herrera, E. A. C. «Academia. Fundamentos de Microbiología Predictiva: aplicaciones teóricas y prácticas.,» [En línea]. Disponible en: http://www.academia.edu/4395247/Practica_1_Microbiologia_Predictiva_Desarrollo_de_un_modelo_de_relacion_entre_D.O_vs_Recuento_en_Placa. [Último acceso: 02 08 2014].
- [33] Tapahuasco, E. Z. «Diseño en parcelas divididas.,» 2010. [En línea]. Disponible en: estadistica.260mb.com/Efrain_DPD.pdf. [Último acceso: 01 08 2014].
- [34] Mantilla, C. *et al* «Efecto biofertilizante del preparado: residuos vegetales - bacteria nativa diazótropa, sobre las variables biométricas en plántulas de *Rhapanus sativus*,» 05 2011. [En línea]. Disponible en: <http://www.revistas.unal.edu.co/index.php/biotecnologia/article/download/22989/23765>.
- [35] Martin, A. *Introducción a la Microbiología del suelo*, Primera ed., México D.F.: Libros y Editoriales, S.A., 1981.
- [36] Terrádez, M. y Ángel, J. «Análisis de la varianza (ANOVA),» [En línea]. Disponible en: <http://www.uoc.edu/in3/emath/docs/ANOVA.pdf>. [Último acceso: 07 08 2014].
- [37] Cáceres, R. Á. *Estadística aplicada a las ciencias de la salud*, Ediciones Díaz de Santos, 2007, p. 509.
- [38] Prasanna, R. *et al* «Morphological, physiochemical and molecular characterization of *Anabaena* strains,» *Elsevier. Microbiological Research*, vol. 161, pp. 187-202, 2006.

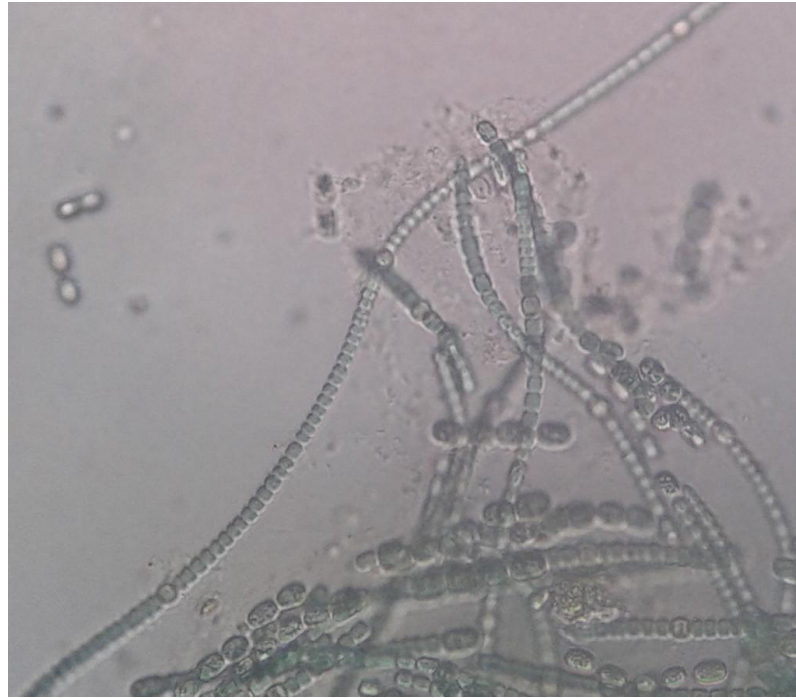
- [39] Pereira, A. L. y Vasconcelos, V. «Classification and phylogeny of the cyanobiont *Anabaena azollae* Strasburger: an answered question?,» *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, vol. 64, p. 1830–1840, 2014.
- [40] The University of Texas at Austin, «UTEX The Culture Collection of Algae, BG-11 Medium,» 03 2009. [En línea]. Disponible en: <http://web.biosci.utexas.edu/utex/mediaDetail.aspx?mediaID=26>. [Último acceso: 11 2013].
- [41] The University of Texas at Austin, «UTEX The Culture Collection of Algae, BG-11(-N) Medium.,» 03 2009. [En línea]. Disponible en: <http://web.biosci.utexas.edu/utex/mediaDetail.aspx?mediaID=180>. [Último acceso: 11 2013].
- [42] Universidad de Antioquia, «Composición y preparación del medio Murashige y Skoog.,» 03 2005. [En línea]. Disponible en: <http://farmacia.udea.edu.co/~biotecnolab/ms.pdf>. [Último acceso: 11 2013].
- [43] Premazzi, G. y Volterra, L. *Microphyte Toxins. A manual for toxin detection, environmental monitoring and therapies to counteract intoxications.*, Roma: Joint Research Centre, 1993.

ANEXOS

Anexo No. 1 Fotografía de *Azotobacter* sp. con tinción de Gram.



Anexo No. 2 Fotografía de *Anabaena* sp.



Anexo No. 3 Fotografía de *Nostoc* sp.



Anexo No. 4 Composición del medio Bold's Basal Medium (BBM).

<i>Component</i>	<i>Stock Solution (g · L⁻¹ dH₂O)</i>	<i>Quantity Used</i>	<i>Concentration in Final Medium (M)</i>
<i>Macronutrients</i>			
NaNO ₃	25.00	10 mL	2.94×10^{-3}
CaCl ₂ · 2H ₂ O	2.50	10 mL	1.70×10^{-4}
MgSO ₄ · 7H ₂ O	7.50	10 mL	3.04×10^{-4}
K ₂ HPO ₄	7.50	10 mL	4.31×10^{-4}
KH ₂ PO ₄	17.50	10 mL	1.29×10^{-3}
NaCl	2.50	10 mL	4.28×10^{-4}
<i>Alkaline EDTA Solution</i>		1 mL	
EDTA	50.00		1.71×10^{-4}
KOH	31.00		5.53×10^{-4}
<i>Acidified Iron Solution</i>		1 mL	
FeSO ₄ · 7H ₂ O	4.98		1.79×10^{-5}
H ₂ SO ₄		1 mL	
<i>Boron Solution</i>		1 mL	
H ₃ BO ₃	11.42		1.85×10^{-4}
<i>Trace Metals Solution</i>		1 mL	
ZnSO ₄ · 7H ₂ O	8.82		3.07×10^{-5}
MnCl ₂ · 4H ₂ O	1.44		7.28×10^{-6}
MoO ₃	0.71		4.93×10^{-6}
CuSO ₄ · 5H ₂ O	1.57		6.29×10^{-6}
Co(NO ₃) ₂ · 6H ₂ O	0.49		1.68×10^{-6}

Fuente: [27].

Anexo No. 5 Composición del medio BG11.

#	Component	Amount	Stock Solution Concentration	Final Concentration
1	NaNO ₃ (Fisher BP360-500)	10 mL/L	30 g/200 mL dH ₂ O	17.6 mM
2	K ₂ HPO ₄ (Sigma P 3786)	10 mL/L	0.8 g/200 mL dH ₂ O	0.23 mM
3	MgSO ₄ ·7H ₂ O (Sigma 230391)	10 mL/L	0.15 g/200 mL dH ₂ O	0.03 mM
4	CaCl ₂ ·2H ₂ O (Sigma C-3881)	10 mL/L	0.72 g/200 mL dH ₂ O	0.24 mM
5	Citric Acid·H ₂ O (Fisher A 104)	10 mL/L	0.12 g/200 mL dH ₂ O	0.031 mM
6	Ferric Ammonium Citrate	10 mL/L	0.12 g/200 mL dH ₂ O	0.021 mM
7	Na ₂ EDTA·2H ₂ O (Sigma ED255)	10 mL/L	0.02 g/200 mL dH ₂ O	0.0027 mM
8	Na ₂ CO ₃ (Baker 3604)	10 mL/L	0.4 g/200 mL dH ₂ O	0.19 mM
9	BG-11 Trace Metals Solution	1 mL/L		
10	Sodium Thiosulfate Pentahydrate (agar media only, sterile) (Baker 3946)	24.8 g/100 mL		1 mM

Fuente: [40].

Anexo No. 6 Composición del medio BG11(0).

#	Component	Amount	Stock Solution Concentration	Final Concentration
1	K ₂ HPO ₄ (Sigma P 3786)	10 mL/L	0.8 g/200 mL	0.22 mM
2	MgSO ₄ ·7H ₂ O (Sigma 230391)	10 mL/L	0.15 g/200 mL	0.03 mM
3	CaCl ₂ ·2H ₂ O (Sigma C-3881)	10 mL/L	0.72 g/200 mL	0.24 mM
4	Citric Acid·H ₂ O (Fisher A 104)	10 mL/L	0.12 g/200 mL	0.012 mM
5	Ferric Ammonium Citrate	10 mL/L	0.12 g/200 mL	0.02 mM
6	Na ₂ EDTA·2H ₂ O (Sigma ED255)	10 mL/L	0.02 g/200 mL	0.002 mM
7	Na ₂ CO ₃ (Baker 3604)	10 mL/L	0.4 g/200 mL	0.18 mM
8	BG-11 Trace Metals Solution	1 mL/L		
9	Sodium Thiosulfate Pentahydrate (agar media only, sterile) (Baker 3946)	1 mL/L	49.6 g/200 mL	1 μM

Fuente: [41].

Anexo No. 7 Composición del medio de Ashby.

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

Fuente: [12]

Anexo No. 8 Composición del medio Murashige & Skoog (MS).

Constituyente	Concentración de la solución madre (g/L)	Volumen de la solución madre por litro de medio
Macros		100 ml
NH ₄ NO ₃	16,5	
KNO ₃	19	
CaCl ₂ .2H ₂ O	4,4	
MgSO ₄ .7H ₂ O	3,7	
KH ₂ PO ₄	1,7	
Micros		10 ml
MnSO ₄ .H ₂ O	1,69	
ZnSO ₄ .7H ₂ O	0,86	
H ₃ BO ₃	0,62	
KI	0.083	
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	0.025	
CuSO ₄ .5H ₂ O 10 ml de solución 25 mg/100ml		10 ml
CoCl ₂ .6H ₂ O 10 ml de solución 25 mg/100ml		
Fuente de hierro		10 ml
FeSO ₄ .7H ₂ O	0.00556	
Na ₂ EDTA.2H ₂ O	0.00746	
Vitaminas		10 ml
Inositol	10	
Nicotínico	0,05	
HCl-Piridoxina	0,05	
Glicina	0,2	
HCl-Tiamina	0,01	

Adicionar al medio 3% de sacarosa y 0.7% de agar.

Fuente: [42].

Anexo No. 9 Caja de LEDs elaborada en laboratorio para realizar la curva de crecimiento de las cianobacterias.

