

Producción de un biofertilizante a partir de un aislamiento de *Azotobacter nigricans* obtenido en un cultivo de *Stevia rebaudiana* Bert

Daniel Borda-Molina¹, Juan Manuel Pardo-García¹, María Mercedes Martínez-Salgado^{1,2,4},
José Salvador Montaña-Lara^{1,2,3*}

¹Departamento de Microbiología, Facultad de Ciencias, Pontificia Universidad Javeriana, ²Laboratorio de Microbiología Ambiental y de Suelos, Pontificia Universidad Javeriana ³Unidad de Investigaciones Agropecuarias (UNIDIA)

⁴Grupo de Biotecnología Industrial y Ambiental.
Cra. 7ª N° 40-62, Bogotá, Colombia.

* jose.montana@javeriana.edu.co

Recibido: 11-07-2008; Aprobado: 17-06-2009

Resumen

Objetivo. Realizar un aislamiento de bacterias fijadoras de nitrógeno para emplearlas en un programa de fertilización bajo un esquema de agricultura orgánica. **Materiales y métodos.** El aislamiento de bacterias fijadoras de nitrógeno se realizó en medio Ashby-benzoato a partir del suelo de un cultivo de *Stevia rebaudiana* Bert. Los aislamientos identificados como *Azotobacter nigricans* fueron evaluados mediante una cinética de crecimiento y la cepa con mayor velocidad se utilizó para la elaboración de un biofertilizante por fermentación discontinua. La evaluación preliminar del biofertilizante se realizó mediante su inoculación en 3 eras de un cultivo de *S. rebaudiana* Bert. y el rendimiento se determinó con base en la producción de biomasa y concentración de glucósidos. **Resultados.** Dos aislamientos (A5 y A6) fueron identificados como *A. nigricans* con base en la caracterización fenotípica y genotípica. El aislamiento A5 se seleccionó para la elaboración del biofertilizante debido a que presentó mejor estabilidad, pigmentación, mayor velocidad de crecimiento 0,1405 h⁻¹ fase exponencial de 18 horas y una producción de AIA promedio de 38,4 mg/ml a las 150 horas. El biofertilizante se obtuvo en medio leche con una concentración celular de 4x10¹² UFC/ml. **Conclusiones.** La evaluación preliminar en campo mostró una correlación positiva entre el aumento de la concentración de glucósidos en las hojas de *S. rebaudiana* y una mayor producción de biomasa en respuesta a la aplicación del biofertilizante.

Palabras clave: AIA, *Azotobacter nigricans*, glucósidos, *Stevia rebaudiana* Bert.

Abstract

Bio-fertilizer production from an isolate of *Azotobacter nigricans* obtained from a plantation of *Stevia rebaudiana* Bert. Objective. To isolate nitrogen fixing bacteria to be used in a fertilization regime of an organic agriculture program. **Materials and methods.** The isolation of nitrogen fixing bacteria was done in an Ashby-benzoate medium from soil of a *Stevia rebaudiana* plantation. Isolates identified as *Azotobacter nigricans* were evaluated by their growth kinetics and the strain with the fastest growth was used for the production of a biofertilizer by discontinuous fermentation. The preliminary evaluation of the biofertilizer was done by its inoculation into three ridges of a plantation of *S. rebaudiana* and yield determination was based upon biomass production and glycoside concentration. **Results.** Two isolates (A5 and A6) were identified as *A. nigricans* based on their phenotypic and genotypic characterization. Isolate A5 was selected for preparing the biofertilizer because it showed a better stability, pigmentation, a faster growth rate (0.1405 h⁻¹ exponential phase of 18 hours) and an average IAA production of 38.4 mg/ml after 150 hours. The bio-fertilizer was obtained in milk medium with a cell concentration of 4x10¹² CFU/ml. **Conclusions.** The preliminary field evaluation showed a positive correlation between the increase of the glycoside concentration in the leaves of *S. rebaudiana* and a higher production of biomass in response to the bio-fertilizer application.

Key words: IAA, *Azotobacter nigricans*, glycosides, *Stevia rebaudiana* Bert.

Resumo

Produção de um bio-fertilizante a partir do isolamento de *Azotobacter nigricans* obtido num cultivo de *Stevia rebaudiana* Bert.

Objetivo: Realizar um isolamento de bactérias fixadoras de nitrogênio para empregá-las num programa de fertilização sob um esquema de agricultura orgânica. **Materiais e métodos:** O isolamento de bactérias fixadoras de nitrogênio realizou-se no meio Ashby-benzoato a partir do solo de um cultivo de *Stevia rebaudiana* Bert. Os isolamentos identificados como *Azotobacter nigricans* foram avaliados mediante uma cinética de crescimento e a cepa com maior velocidade utilizou-se para a elaboração de um bio-fertilizante por fermentação descontínua. A avaliação preliminar do bio-fertilizante realizou-se mediante sua inoculação em 3 eras de um cultivo de *S. rebaudiana* Bert., e o rendimento determinou-se com base na produção de biomassa e concentração de glucosídeos. **Resultados:** Dois isolamentos (A5 e A6) foram identificados como *A. nigricans* com base na caracterização fenotípica e genotípica. O isolamento A5 selecionou-se para a elaboração do bio-fertilizante por apresentar melhor estabilidade, pigmentação, maior velocidade de crescimento ($0,1405 \text{ h}^{-1}$ fase exponencial de 18 horas) e uma produção de AIA media de $38,47 \mu\text{g/ml}$ as 150 horas. O bio-fertilizante obteve-se no meio leite com uma concentração celular de 4×10^{12} UFC/ml. **Conclusões.** A avaliação preliminar no campo apresentou uma correlação positiva entre o aumento da concentração de glucosídeos nas folhas de *S. rebaudiana* e uma maior produção de biomassa como resposta à aplicação do bio-fertilizante.

Palavras chave: AIA, *Azotobacter nigricans*, glucosídeos, *Stevia rebaudiana* Bert.

Introducción

Stevia rebaudiana es una planta herbácea perteneciente a la familia Compositae, originaria de la Sierra de Amambai, en la frontera entre Brasil y Paraguay. Su importancia radica en la presencia de un edulcorante en sus hojas; steviosido y rebaudiosido, no calórico (300-350 veces más dulce que la sacarosa) los cuales tienen múltiples utilidades medicinales como: efecto hipoglicémico, anticáncer y reducción de problemas estomacales y de la piel, entre otros (1).

Stevia se cultiva en Colombia, principalmente en los departamentos de Antioquia, Valle del Cauca y Llanos orientales, la variedad empleada es Morita 1 (2); gran parte de la producción se exporta a Europa y Asia, mercados que son muy exigentes y no aprueban el uso de fertilizantes químicos; esta condición además de la baja fertilidad de los suelos donde se cultiva *Stevia* dificultan su producción. En los últimos años se han buscado alternativas viables para mitigar el problema de baja fertilidad de los suelos y reducir la aplicación indiscriminada de agroquímicos. En este contexto las bacterias del género *Azotobacter* se presentan como una alternativa útil debido a que es un fijador de nitrógeno de vida libre, promueve el crecimiento de raíces lo que conlleva a un aumento en la concentración de materia seca (3), contribuye con la solubilización de fosfatos y calcio (4) y se ha reportado como eficiente productor de fitohormonas, sideróforos y sustancias antifúngicas (4, 5, 6). De esta forma *Azotobacter* spp, se puede considerar como un biofertilizante con un amplio espectro de aplicación que incluye especies como maíz, trigo, zanahoria, papa entre otros (7). El objetivo del presente estudio fue realizar el aislamiento de una cepa nativa fijadora de nitrógeno, que pueda ser empleada como un biofertilizante, en el cultivo de *S. rebaudiana* Bert.

Materiales y métodos

Ubicación y muestreo de suelo

Las muestras de suelo rizosférico fueron obtenidas en el segundo semestre de 2007 en un cultivo de *Stevia*, ubicado en el municipio de Puerto López (Meta) $04^{\circ}06'$ Latitud Norte y $72^{\circ}50'$ Longitud Oeste La región cuenta con una temperatura promedio de 27°C , precipitación promedio anual de 2000 mm, y humedad relativa de 75%. El muestreo se realizó en forma de X, tomando 10 muestras cada una de 2 kg aproximadamente, a una profundidad entre 10-20 cm. Las muestras fueron colocadas en bolsas de papel y transportadas al laboratorio en nevera de icopor a una temperatura de 4°C para su inmediato procesamiento (8).

Las muestras de suelo se pasaron por un tamiz de 4 mm (6). La lectura del pH se realizó de acuerdo al método propuesto por Van Lierop (1981) (9), suspendiendo la muestra en agua destilada 1:1 (p/v).

Aislamiento de *Azotobacter* spp

El aislamiento se realizó en agar Ashby a partir de gránulos de suelo de acuerdo con la metodología descrita por Novo *et al.* (1983) (10). Luego de 3 a 8 días de incubación a 32°C , se obtuvo el crecimiento de colonias mucoides, con pigmento oscuro características de *A. chroococcum* y *A. nigricans* (6). Las colonias aisladas fueron conservadas con glicerol en una concentración final del 50% (v/v) a -70°C (6).

Caracterización de *Azotobacter* spp

Se realizó una caracterización macro y microscópica de cada uno de los aislamientos para confirmar la morfología

típica de bacterias del género *Azotobacter*. Paralelamente y como criterio de selección, se evaluó el crecimiento en agar Ashby-benzoato luego de 36 horas y la estabilidad de la pigmentación luego de tres pases sucesivos. Se obtuvieron 15 aislamientos a partir de los gránulos de suelo, de los cuales solamente dos cumplieron con los criterios establecidos, a éstos se les realizó una tipificación bioquímica utilizando la batería de azúcares al 1% (p/v): ramnosa, sacarosa, sorbitol, fructosa, manitol y maltosa, empleada por Jiménez (2007) (11) en caldo base rojo de fenol. Adicionalmente, se realizaron pruebas bioquímicas en benzoato al 1% (p/v), y caldo nitrito las cuales se incubaron a 32°C durante 48 horas. También se incluyeron la prueba de oxidasa y peroxidasa para los dos aislamientos (12).

La caracterización molecular de los dos aislamientos, se llevó a cabo mediante el análisis de restricción del DNA ribosomal 16S amplificado (ARDRA) usando los iniciadores Y1 y Y3 y las enzimas de restricción *Alu* I, *Hpa* II y *Rsa* I (6, 11, 13). Los resultados obtenidos del ARDRA fueron comparados con la restricción virtual de secuencias equivalentes de bacterias fijadoras de nitrógeno obtenidas del Genebank.

Se realizó una cinética de crecimiento partiendo de un inóculo con una concentración celular de 3×10^8 UFC/ml, con relación $\frac{1}{2}$ utilizando caldo nutritivo. El cultivo se incubó a 30°C y 120 rpm. El crecimiento fue monitoreado por turbidimetría registrando la absorbancia a 540 nm cada 6 horas durante 72 horas con el fin de obtener las UFC/ml. La velocidad de crecimiento se empleó como último criterio de selección para la cepa que finalmente se utilizó en la producción del biofertilizante.

Evaluación de la actividad fosfatasa y producción AIA

Con el aislamiento seleccionado de *Azotobacter* spp se realizó una evaluación cualitativa de solubilización de fosfatos siguiendo la técnica descrita por Vásquez *et al.* (2000) (14). Para tal fin el cultivo se igualó al tubo 1 del patrón de Mc Farland y se incubó en agar picovskaya modificado (15), a temperatura de 30°C por un periodo de 24-48 horas. Se tomó como efecto solubilizador la presencia de un halo de aclaración mayor a 5 mm alrededor del pitillo de 1 cm de diámetro. Para cuantificar la actividad fosfatasa se empleó la técnica de p-nitrofenil fosfato (16). La actividad se evaluó en medio leche (medio de producción) y medio Pikovskaya (17) (medio inductor) (17), registrando el valor de absorbancia cada cuatro horas por un período de 24 horas.

Adicionalmente se realizó la evaluación de la producción de AIA en medio leche (medio de producción) y medio B (medio inductor) por parte de la cepa de *Azotobacter* seleccionada, siguiendo la metodología propuesta por Bric *et al.* (1991) (18); modificado por Celis & Gallardo (2007) (19).

Producción del biofertilizante

Con la cepa identificada como *Azotobacter nigricans* se realizó la producción de un biofertilizante en medio leche por fermentación discontinua (30°C y 120 rpm) partiendo de un preinóculo ajustado al patrón No. 3 de Mc Farland. El proceso se realizó con un volumen efectivo de trabajo de $\frac{1}{2}$. Transcurridas 24 horas se realizó la lectura de UFC/ml por la técnica de microgota, alcanzando una concentración de 12×10^8 UFC/ml. El inóculo obtenido se llevó a un biorreactor de mezcla completa de 2L con una relación de 60% de VET, agitación de 120 rpm a 32°C durante 24 horas y se realizaron muestreos cada 4 horas para verificar la concentración celular en UFC/ml. El mismo procedimiento se realizó en un medio comercial de referencia.

Evaluación preliminar del biofertilizante en campo

Se realizó la aplicación del biofertilizante (*A. nigricans*) en tres eras de un cultivo de *S. rebaudiana* (50 x 1,20 m c/u). La evaluación de la respuesta del cultivo se llevó a cabo hasta la primera producción (180 días) con base en las variables producción de biomasa y concentración de sólidos solubles totales (°Brix), que son considerados indicadores de rendimiento y calidad respectivamente.

Análisis estadístico

La actividad fosfato solubilizadora, síntesis de AIA, producción del biofertilizante en los diferentes medios, así como la evaluación preliminar en campo fueron comparados mediante un análisis de varianza y la aplicación de la prueba de Tukey empleando el software Statistics®.

Resultados

Características del suelo

Se encontró un pH de 6,5 considerado óptimo para el desarrollo de la planta, una baja conductividad eléctrica (0,53 ds/m), lo que indica que no habían problemas de salinidad.

Sin embargo, se encontró un bajo porcentaje de materia orgánica, altos niveles de sodio (10 ppm); niveles subóptimos de fósforo y nitrógeno, además de una marcada deficiencia de elementos menores.

Caracterización de *Azotobacter* spp

Con la técnica de gránulos de suelo se obtuvo un porcentaje de recuperación promedio de 30% de bacterias fijadoras de nitrógeno. En agar Ashby se observó la formación de halos transparentes alrededor de algunos gránulos consecuencia de la solubilización del carbonato de calcio. Se recuperaron 15 cepas, dos de las cuales (A5 y A6) cumplieron con los criterios de selección preestablecidos. Estos aislamientos mostraron características macro y microscópicas similares a las reportadas para *A. chroococcum*, *A. vinelandii* y *A. nigricans* como: colonias irregulares con alta producción de exopolisacáridos, pigmentación, forma bacilar corta y formación de quistes (6).

Las pruebas bioquímicas con 8 fuentes de carbono, nitrato/nitrito, y peroxidasa, fueron similares para los aislamientos A5 y A6. Este resultado es consistente con los obtenidos en la caracterización macroscópica y microscópica (**Figura 1**), por lo que se podría sugerir que corresponden a cepas filogenéticamente cercanas.

Para la identificación molecular de las cepas seleccionadas, se realizó el análisis de restricción del DNA ribosomal 16S, con la enzima *Alu* I la cual mostró un patrón de 3

bandas de tamaño superior a 100 pb (**Figura 2**), con la enzima *Hpa* II también se obtuvieron 3 bandas para A5 y A6. Finalmente, con la enzima *Rsa* I se obtuvieron 5 bandas para la cepa A5. Después de comparar el patrón de bandas obtenido con las 3 enzimas con los patrones generados después de un análisis de restricción virtual de secuencias del DNA ribosomal 16S obtenidas del Genebank, se encontró que los dos aislamientos son similares a *Azotobacter nigricans*.

Para seleccionar la cepa que se utilizó en la preparación del biofertilizante, se comparó la velocidad de crecimiento (mx) y el tiempo de duplicación (td) de A5 y A6. Ambas cepas presentaron un comportamiento de cinética de orden 1 pero la mayor velocidad de crecimiento ($p < 0,05$) se observó para la cepa A5 $0,1405h^{-1}$ - 4,93 h. En este caso se observó que aproximadamente a la hora 24 se alcanza la fase exponencial y entre las 24 y 72 h se registró la fase estacionaria, resultado que es similar al reportado por Peniche, (2005) (23) en ensayos con *Azotobacter*. De otra parte se encontró un comportamiento atípico (bifásico) de *Azotobacter*, posiblemente debido al tiempo requerido para la inducción de ciertas enzimas para su metabolismo.

Evaluación de la actividad fosfatasa y producción AIA

La prueba semicuantitativa para evaluar la actividad fosfatasa del aislamiento A5 no registró halos de solubilización aunque se observó acidificación del me-

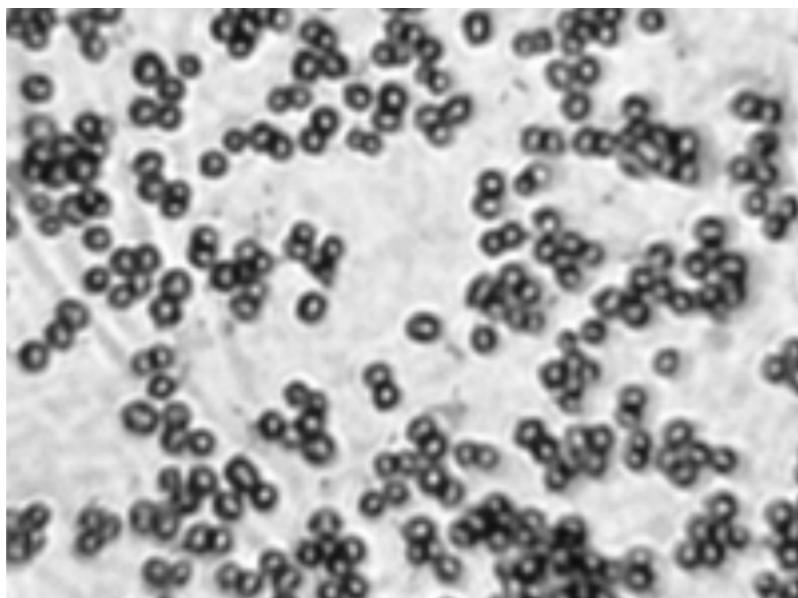


Figura 1. Presencia de quistes de *Azotobacter*

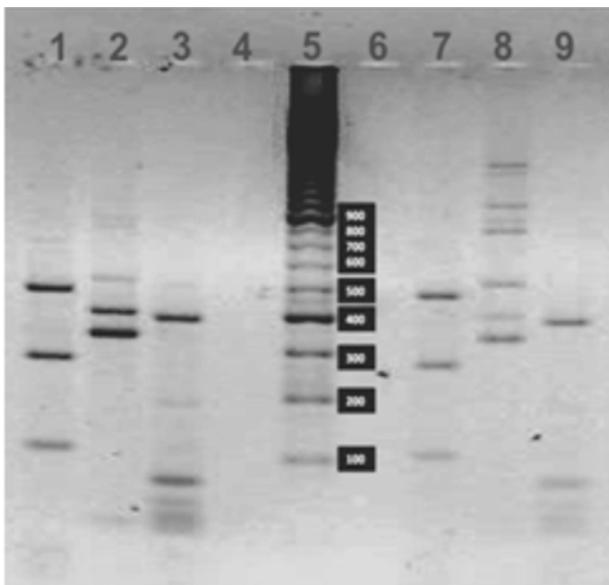


Figura 2. Electroforesis en gel de agarosa al 2,0%; digestión con la enzima *Alu* I (carriles 1 y 7 cepas A5 y A6 respectivamente), *Hpa* II (carriles 2 y 8 cepas A5 y A6 respectivamente) y *Rsa* I (carriles 3 y 9 cepas A5 y A6 respectivamente). Marcador de peso molecular 100 pb (carril 5).

dio. Se esperaba que como resultado de la acidificación del medio por la acción de los ácidos orgánicos producidos por el microorganismo, se obtuviera una solubilización del fosfato (15). En el medio inductor se presentó una mayor actividad fosfatasa (8,2 UF) siendo máxima en la hora 20, comparada con la actividad en medio leche (2,06 UF) para el mismo periodo de tiempo ($p < 0,05$) lo que sugiere que el medio leche no es ideal para inducir la actividad.

La producción de AIA para el aislamiento A5 fue superior en el medio B (38,4 mg/m), comparado con la producción en medio leche (16,89 mg/ml) ($p < 0,05$); sin embargo, estos valores se encuentran en el rango promedio 3 y 65 mg/ml reportado en la literatura para diferentes especies de *Azotobacter* consideradas promotoras de crecimiento vegetal (25).

Producción del biofertilizante

Una vez identificadas las características de crecimiento de la cepa seleccionada (A5), se realizó la producción del biofertilizante. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas en cuanto a la producción de biomasa en los medios leche y nutritivo ($p > 0,05$) obteniéndose una concentración celular de 4×10^{12} UFC/ml. Este valor fue superior al reportado por Peniche, (2005) (23), quien me-

dante una fermentación discontinua en caldo nutritivo, obtuvo una concentración de 10^8 UFC/ml. En el momento de realizar la inoculación el producto se recomienda llevar a un volumen de 200 L para obtener una concentración final de 10^9 UFC/ml.

Evaluación preliminar del biofertilizante en campo

Después de 180 días de evaluación en el cultivo de *Stevia rebaudiana*, se obtuvo una producción de biomasa fresca en el tratamiento control de 497 kg/ha mientras que en el tratamiento con el biofertilizante (*A. nigricans*) se obtuvo un valor de biomasa de 577 kg/ha, que equivale a un aumento del 15% en la producción (Figura 3). Esto demuestra una correlación positiva entre la aplicación de una bacteria fijadora de nitrógeno y el rendimiento de biomasa de *S. rebaudiana*.

En cuanto a la concentración de glucósidos, se encontró que probablemente el biofertilizante tiene un efecto positivo pues se encontraron valores superiores para el tratamiento con *A. nigricans* (12,4 °Brix) comparado con el control que presentó valores promedio de 11,39 °Brix (Figura 3).

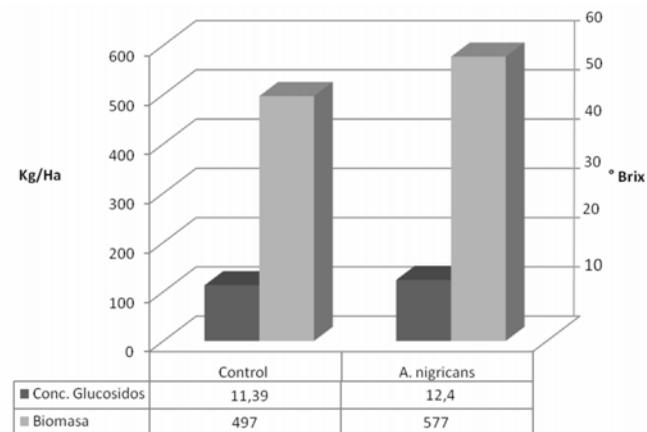


Figura 3 Concentración de glucósidos (°Brix) y producción de biomasa (kg/ha) para el control y *A. nigricans*.

Discusión

Los niveles subóptimos de fósforo y nitrógeno encontrados en el suelo del cultivo de *S. rebaudiana* previo a la aplicación del biofertilizante sumado a la deficiencia marcada de elementos menores a excepción del hierro y el

bajo contenido de materia orgánica consecuencia del escaso aporte de biomasa (2,2 a 3,8 ton/ha/año) (20) sugieren una media o baja fertilidad del suelo. Este hecho justifica la aplicación de un biofertilizante con capacidad para incrementar la disponibilidad de nitrógeno y fósforo para un adecuado crecimiento y desarrollo de la planta. En este contexto el género *Azotobacter* se propone como una buena alternativa (11, 19, 22).

La caracterización fenotípica y molecular de los aislamientos A5 y A6, permitió confirmar su ubicación taxonómica como miembros del género *Azotobacter*. Después de comparar el patrón de bandas obtenido con las 3 enzimas y los patrones generados después de un análisis de restricción virtual de secuencias del DNA ribosomal 16S obtenidas del Genbank, se encontró que los dos aislamientos (A5 y A6) son similares a *Azotobacter nigrigans* y posiblemente corresponden a la misma cepa.

A. nigrigans ha sido encontrado en México en la rizósfera de algunas leguminosas como el frijol (19) También se ha encontrado en la rizósfera de arroz donde produce un incremento en la asimilación del nitrógeno y como consecuencia mayor rendimiento en biomasa (22). En Colombia se ha encontrado en el departamento de Boyacá en cultivos de zanahoria, coliflor y espinaca (11).

Una vez confirmada la identidad de los dos aislamientos como *A. nigrigans*, se seleccionó el aislamiento A5 por presentar una mayor velocidad de crecimiento con una fase exponencial y estacionaria similar a las reportadas por Peniche, (2005) (23) en trabajos con *Azotobacter*. De otra parte se encontró un comportamiento atípico (bifásico) de *Azotobacter*, posiblemente debido al tiempo requerido para la inducción de ciertas enzimas para su metabolismo. Wong *et al.*, (2005) (24) afirman que hay enzimas que se expresan constitutivamente y los metabolitos pueden detener la asimilación de ciertos sustratos.

Con relación a las actividades enzimáticas evaluadas, fue evidente que la actividad fosfatasa registrada en medio leche, medio de producción, fue muy baja (2,06 UF) indicando que este medio no es adecuado para inducir dicha actividad. De otra parte, en el medio inductor se registró una actividad ligeramente superior (8,2 UF) que sigue siendo baja si se compara con los valores de actividad fosfatasa reportados para *Azotobacter chroococcum* en medio Picovskaya (32,893 UF) (15). Esta situación indica que especies del género *Azotobacter* presentan diferencias en la actividad fosfatasa que puede estar condicionada por el medio ambiente nativo del microorganismo.

En cuanto a la producción de AIA se encontró, en los dos medios, valores similares a los reportados para varias especies de *Azotobacter* consideradas promotoras de crecimiento (25), razón por la cual la producción de biomasa y concentración de glucósidos fueron superiores en los tratamientos con el biofertilizante.

Los medios leche y nutritivo no mostraron diferencias significativas en la producción de biomasa para la formulación del biofertilizante, pero considerando el menor costo que representaría emplear el medio leche para producirlo, se decidió utilizarlo para ajustar el inóculo hasta una concentración final de 10^9 UFC/ml, óptima para su aplicación en campo (26).

La evaluación del biofertilizante en un cultivo de *Stevia rebaudiana* mostró un incremento de un 15% en la producción de biomasa fresca comparado con el tratamiento control, Kumar *et al.*, (2001) han reportado aumento en la producción de biomasa del grano de trigo en un 11,4% al aplicar un inóculo a base de *Azotobacter* (27) y Chandrasekar *et al.* (2006) encontraron con inoculantes a base de *Azotobacter*, un incremento correspondiente a un 12,1% en pastos del género *Echinochloa* (28). Para la concentración de glucósidos en las hojas de las plantas en el tratamiento con *Azotobacter*, se observó un comportamiento similar, ocasionado posiblemente por síntesis de reguladores de crecimiento vegetal. Hormonas como las giberelinas, presentan una ruta de síntesis similar al steviosido (ruta del ácido mevalónico), excepto por la síntesis de kaureno. Richman *et al.*, (1999) (29) afirma que la biosíntesis de estos dos compuestos está separada temporal y espacialmente y depende de las condiciones climáticas. Debido a que la síntesis de steviosido se da en su mayoría en hojas viejas y la de ácido giberélico en hojas jóvenes, se propone que este glucósido es sintetizado por la planta para evitar una sobreproducción de ácido giberélico (29).

Conclusiones

La aplicación de un biofertilizante a base de *Azotobacter nigrigans*, incrementó la producción de biomasa en un cultivo de *Stevia rebaudiana* en un 15% y ligeramente la concentración de glucósidos en las hojas en comparación al tratamiento control. Este hecho sugiere que puede ser considerado como una buena alternativa para mejorar las condiciones nutricionales y mantener una producción orgánica sostenible.

Agradecimientos

Los autores agradecen especialmente a la Federación Internacional de Universidades Católica FIUC, a Bioagrícola del Llano y a Agroestevia S.A.

Financiación

Esta investigación fue realizada gracias al apoyo de la Federación Internacional de Universidades Católicas FIUC y el Centro Coordinador de la Investigación CCI-FIUC, en el marco del proyecto "Formación de técnicos para mejorar la calidad de suelos en países en vía de desarrollo: empleo de compost mejorado biotecnológicamente en cultivos orgánicos". ID: 000158.

Conflictos de intereses

Los autores expresan que no existen conflictos de intereses alrededor de los resultados de esta investigación.

Referencias

1. Cleuza A, Fontana J, Da Costa S. Sweet diterpenic glycosides balance of a new cultivar of *Stevia rebaudiana* (Bert.) Bertoni: Isolation and quantitative distribution by chromatographic, spectroscopic, and electrophoretic methods. *Process Biochemistry* 2005; **40**: 3587-3594.
 2. Maya D. *Stevia rebaudiana*-Bertoni. Primera edición. Corpoica. Bogotá, D.C. Colombia. 2000; 16 p.
 3. Kizilkaya R. Yield response and nitrogen concentrations of spring wheat (*Triticum aestivum*) inoculated with *Azotobacter chroococcum* strains. *Ecological Engineering* 2008; **33**: 150-156.
 4. Kumar V, Narula N. Solubilization of inorganic phosphates and growth emergence of wheat as affected by *Azotobacter chroococcum* mutans. *Biology Fertility Soils* 1999; **28**: 301-305.
 5. Kumar V, Singh K. Enriching vermi-compost by nitrogen fixing and phosphate solubilizing bacteria. *Bioresource Technology* 2000; **76**: 173-175.
 6. Aquilanti F, Favillib F, Clementi A. Comparison of different strategies for isolation and preliminary identification of *Azotobacter* from soil samples. Firenze, Italy. *Soil Biology & Biochemistry* 2004; **36**: 1475-1483.
 7. Pandey A, Sharma A, Palni L. Influence of bacterial inoculation on maize in upland farming systems of the Sikkim Himalaya. *Soil Biological Biochemistry* 1997; **30** (3): 379-384.
 8. Martínez M, Campos C, Matiz A, Rodríguez M, Cáceres L. Técnicas en microbiología de suelos y lodos proyecto CIC-FIUC formación de técnicas para mejorar la fertilidad de suelos. Primera edición. Javegraf. Bogotá, D.C. Colombia. 2006; 22-25.
 9. Van Lierop. Conversion of organic soil pH values measured in water, 0.01M CaCl₂ or 1N KCl. *Canadian Journal of Soil Science* 1981; **6**: 577-579.
 10. Novo R, Quintana E, Valdés R. *Prácticas de microbiología*. Primera edición. Instituto Superior de Ciencias Agropecuarias de La Habana. Facultad de Agronomía. Cuba. 1983; 47-50.
 11. Tejera N, Lluch C, Martínez M, González J. Isolation and characterization of *Azotobacter* and *Azospirillum* strains from the sugarcane rhizosphere. *Plant and Soil* 2005; **27**: 223-232.
 12. Holt J, Krieg N, Sneath P, Stanley J. *Bergey's manual of determinative bacteriology*. Novena edición. Lippincott Williams & Wilkins. Philadelphia. 2000; 9787 p.
 13. Magalhães L, Maltempi E, Baler O, Baldani J, Dobereiner J, DE Oliveira F. 16S Ribosomal DNA characterization of nitrogen-fixing bacteria isolated from Banana (*Musa spp.*) and Pineapple (*Ananas comosus* (L.) Merrill). *Applied Environmental Microbiology* 2001; **67**: 2375-2379.
 14. Vázquez P, Holguín G, Puente M, Cortés A, Bashan Y. Phosphate solubilizing microorganisms associated with the rhizosphere of mangroves in a semiarid coastal lagoon. *Biology and Fertility of Soils* 2000; **30**: 460-468.
 15. Sundara R, Sinha M. Phosphate dissolving microorganisms in the Soil and Rhizosphere. *Indian Journal of Agricultural Sciences* 1963; **33**: 272-278.
 16. Fujita H. Über die Mikrobestimmung der Blutphosphatase. *Journal of Biochemistry* 1937; **30**: 69-87.
 17. Pikovskaya R. Mobilization of phosphorus in soil in connection with the vital activity in some microbial species. *Mikrobiologiya* 1948; **17**: 362-379.
 18. Bric J, Bostock R, Silvestone S. Rapid *in situ* assay for Indoleacetic Acid production by bacteria immobilized
-

- on a nitrocellulose membrane. *Applied Environmental Microbiology* 1991; 57 (2): 535-538.
19. Celis L, Gallardo I, Rodríguez M. Estandarización de un método para la detección ácido indol acético en cultivos microbianos. 2009. Artículo en preparación.
 20. Rao I, Rippstein G, Escobar G, Ricaurte J. Agroecología y biodiversidad de las sabanas en los Llanos Orientales de Colombia. Ed. Ripstein, Georges, Escobar Germán, Motta Francisco. *CIAT*. Colombia. 2001; 46-63.
 21. Esquivel G, Velázquez V, Rojas L, Cerrato R, Calva G, Fernández L, Rodríguez R. Efecto del queroseno en el enquistamiento de *Azotobacter nigricans*. *Instituto Mexicano del Petróleo*, México, DF 2001; 1: 1-2.
 22. Piao Z, Cui Z, Yin B, Hu J, Zhou C, Xie C, Su B, Yin S. Changes in acetylene reduction activities and effects of inoculated rhizosphere nitrogen-fixing bacteria on rice. *Biology Fertility Soils* 2005; 41: 371-378.
 23. Peniche H. Aislamiento y evaluación de rizobacterias del género *Azotobacter* con importancia en la mejora de suelos de producción de tomate (*Lycopersicon esculentum*) bajo invernadero. **Tesis de Maestría**. Facultad de Ciencias. Pontificia Universidad Javeriana. Bogotá, 2005; 45-50, 62-69.
 24. Wong T, Pei H, Bancroft K, Childers G. Diauxic Growth of *Azotobacter vinelandii* on Galactose and Glucose: Regulation of Glucose Transport by Another Hexose. *Applied and environmental microbiology* 2005; 61 (2): 430-433.
 25. Anwar G. Production of growth hormones and nitrogenase by diazotrophic bacteria and their effect on plant growth. PhD Tesis. University of the Punjab. Lahore, 2000.
 26. Sylvia D. *Principles and Applications of Soil Microbiology*. Segunda edición. Prentice Hall. New Jersey. 2005; 640 p.
 27. Kumar V, Kumar R, Narula N. Establishment of phosphate-solubilizing strains of *Azotobacter chroococcum* in the rhizosphere and their effect on wheat cultivars under green house conditions. *Microbiological Research* 2001; 156: 87-93.
 28. Chandrasekar B, Ambrose G, Jayabalan N. Influence of biofertilizers and nitrogen source level on the growth and yield of *Echinochloa frumentacea* (Roxb.) Link. *Journal of Agricultural Technology* 2005; 1 (2): 223-234.
 29. Richman A, Gijzen M, Starratt A, Yang Z, Brandle J. Diterpene synthesis in *Stevia rebaudiana*: recruitment and up-regulation of key enzymes from the gibberellin biosynthetic pathway. *The Plant Journal* 1999; 19: 411-421.