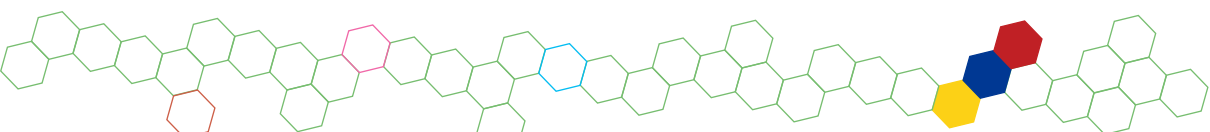


Biotecnología Aplicada al Sector Agropecuario en el departamento de Sucre



Eder Dadner **Durango Ballesteros**
Karen Maria **De Hoyos Correa**
Luty del Carmen **Gomezcaceres Pérez**
Heberto **Polanco Ortega**
Javier Darío **Beltrán Herrera**
Isidro Elías **Suárez Padrón**
Lucía Candelaria **Díaz Narváez**
Oscar Elías **Carmona Wilches**
María Paulina **Torres Pérez**

Karol Liseth **Rueda Concha**
Adrián Benito **Revollo Pérez**
Jhoan Alonso **Cardona Doria**
Yilcer **Molina Durango**
Luis Eliecer **Oviedo Zumaque**
Marcela **Argumedo García**
César **Betancur Hurtado**
Liseth Paola **Pérez Flórez**



Biotecnología aplicada al sector agropecuario en el departamento de Sucre

Núcleo

Innovación y desarrollo de productos biotecnológicos (bioinsumos, bioproductos, bioprocesos) y bioremediación.

Eder Dadner Durango Ballesteros

Karen María De Hoyos Correa

Luty del Carmen Gomezcaeres Pérez

Heberto Polanco Ortega

Javier Darío Beltrán Herrera

Isidro Elías Suárez Padrón

Lucía Candelaria Díaz Narváez

Oscar Elías Carmona Wilches

María Paulina Torres Pérez

Karol Liseth Rueda Concha

Adrián Benito Revollo Pérez

Jhoan Alonso Cardona Doria

Yillcer Molina Durango

Luis Eliecer Oviedo Zumaque

Marcela Argumedo García

César Betancur Hurtado

Liseth Paola Pérez Flórez



2019

Este libro es resultado de investigación, evaluado bajo el sistema doble ciego por pares académicos.

Diego Fernando Hernández Losada

Director de Colciencias

Edgar Enrique Martínez Romero

Gobernación de Sucre

Merlys Cristina Rodelo Martínez

Secretario de Educación Departamental de Sucre

Noel Morales Tuesca

Rector de la Corporación Universitaria del Caribe- CECAR

Jhon Víctor Vidal Durango

Vicerrector de Ciencia, Tecnología e Investigación CECAR

Piedad Martínez Carazo

Directora Científica Proyecto

Andrés Vergara Narváez

Asistente Operativo del Proyecto

Rafael Bustamante Lara

Coordinador de núcleos

Jorge Luis Barboza

Coordinador Editorial CECAR

Libia Narváez Barbosa

Directora Literaria

© 2019, Eder Dadner Durango Ballesteros, Karen Maria De Hoyos Correa, Luty del Carmen Gomezcaeres Pérez, Heberto Polanco Ortega, Javier Darío Beltrán Herrera, Isidro Elías Suárez Padrón, Lucía Candelaria Díaz Narváez, Oscar Elías Carmona Wilches, María Paulina Torres Pérez, Karol Liseth Rueda Concha, Adrián Benito Revollo Pérez, Jhoan Alonso Cardona Doria, Yilcer Molina Durango, Luis Eliecer Oviedo Zumaque, Marcela Argumedo García, César Betancur Hurtado, Liseth Paola Pérez Flórez, autores

ISBN: 978-958-5547-06-3 (impreso)

ISBN: 978-958-5547-16-2 (digital)

DOI: <https://doi.org/10.21892/9789585547063>

Sincelejo, Sucre, Colombia

Biotecnología aplicada al sector agropecuario en el departamento de Sucre. Núcleo Innovación y desarrollo de productos biotecnológicos (bioinsumos, bioproductos, bioprocesos) y bioremediación. / Eder Dadner Durango Ballesteros...[y otros dieciséis]. -- Sincelejo : Editorial CECAR, 2019.

248 páginas : ilustraciones, gráficas, tablas ; 23 cm.

Incluye referencias al final de cada capítulo.

ISBN: 978-958-5547-06-3 (impreso)

ISBN: 978-958-5547-16-2 (digital)

1. Cultivo agrícola - LEMB 2. Fertilizantes - LEMB 3. Microorganismo - LEMB 4. Bacteria - LEMB I. De Hoyos, Karen II. Gomezcaeres, Luty III. Polanco, Heberto IV. Beltrán, Javier V. Suarez, Isidro VI. Díaz, Lucia VII. Carmona, Oscar VIII. Torres, María IX. Rueda, Karol X. Revollo, Adrián XI. Cardona, Jhoan XII. Molina, Yilcer XIII. Oviedo, Luis XIV. Argumedo, Marcela XV. Betancur, Cesar XVI. Pérez, Liseth XVII. Título.

631.5233 B6168 2019

CDD 21 ed.

CEP - Corporación Universitaria del Caribe, CECAR. Biblioteca Central - COSiCUC

Tabla de Contenido

Presentación	9
CAPÍTULO 1	
IMPORTANCIA DE LA BIOTECNOLOGÍA EN EL DEPARTAMENTO DE SUCRE	11
Introducción.....	13
Referencias Bibliográficas	17
CAPÍTULO 2	
MICROPROPAGACIÓN DE ÑAME ESPINO (<i>DIOSCOREA ROTUNDATA</i>, POIR), CULTIVAR BOTÓN EN SISTEMA DE CULTIVO DOBLE FASE	19
Introducción.....	21
Metodología	23
Comparación del desarrollo in vitro de la especie <i>D. rotundata</i> , cv. Botón en el sistema de cultivo convencional y doble fase a través del tiempo.....	24
Evaluación del desarrollo in vitro de la especie <i>D. rotundata</i> , cv. Botón en el sistema de cultivo convencional y doble fase a través del tiempo.	25
Diseño y análisis estadístico.	26
Comparación del desarrollo in vitro de la especie <i>D. rotundata</i> , cultivar Botón en sistema de cultivo convencional y sistema de cultivo doble fase a través del tiempo.	26
Conclusiones.....	32
Referencias Bibliográficas	33
CAPÍTULO 3	
EFFECTO DEL GENOTIPO, TIPO DE EXPLANTE Y EL PICLORAM EN LA INDUCCIÓN DE LA EMBRIOGÉNESIS SOMÁTICA EN <i>DIOSCOREA ROTUNDATA</i>	37
Introducción.....	39

Contenido

Metodología	41
Diseño y análisis estadístico.....	41
Inducción de masas proembrogénicas.	41
Conclusión.....	50
Referencias Bibliográficas	51

CAPÍTULO 4

EFFECTO DE LA SACAROSA Y MATRIZ DE CULTIVO SOBRE EL PROCESO DE MICROTUBERIZACIÓN EN <i>DIOSCOREA ROTUNDATA</i> CULTIVAR BOTÓN	57
--	-----------

Introducción.....	59
Metodología	60
Fase 1: Evaluación del efecto de la sacarosa y el tipo de matriz del medio de cultivo sobre el proceso de tuberización in vitro en <i>D. rotundata</i> cultivar Botón	60
Evaluación del proceso de microtuberización	61
Diseño y análisis estadístico.	61
Fase 2: Evaluación del efecto de la sacarosa y el tipo de matriz del medio cultivo sobre el porcentaje de brotación de los microtubérculos	62
Evaluación del porcentaje de brotación de los microtubérculos.	62
Diseño y análisis estadístico.	62
Resultados y Discusión.....	63
Fase 1: Evaluación del efecto de la sacarosa y el tipo de matriz del medio de cultivo sobre el proceso de tuberización in vitro en <i>D. rotundata</i> cultivar Botón.....	63
Número y masa fresca promedio de los microtubérculos producidos por planta	65
Fase 2: Evaluación del efecto de la sacarosa y el tipo de matriz del medio cultivo sobre el porcentaje de brotación de los microtubérculos	67
Conclusiones.....	70
Referencias Bibliográficas	70

CAPÍTULO 5

TOLERANCIA AL ESTRÉS SALINO EN PLANTAS DE ÑAME ESPINO (*DIOSCOREA ROTUNDATA*. POIR).....73

Introducción.....	75
Materiales y métodos.....	81
Brotación de tubérculos de ñame (<i>dioscórrea rotundata</i>) bajo estrés salino.....	88
Sobrevivencia de tubérculos de ñame (<i>dioscórrea rotundata</i>) al estrés salino.....	90
Fluorescencia de la clorofila en plantas de ñame <i>dioscórrea rotundata</i>	90
Conductividad eléctrica del suelo.....	91
Conclusiones.	91
Referencias Bibliográficas	92

CAPÍTULO 6

APLICACIÓN DE BIOFERTILIZANTE EN LA PROPAGACIÓN DE PLANTAS *IN VITRO* Y CONVENCIONAL DE ÑAME ESPINO CULTIVAR BOTÓN *DIOSCOREA ROTUNDATA*. POIR95

Introducción.....	97
Propagación de ñame.	98
Área foliar total (aft).	101
Peso seco total de la planta.....	102
Pigmentos fotosintéticos (clorofilas y carotenoides)	103
Conclusiones.....	104
Referencias Bibliográficas	104

CAPÍTULO 7

EVALUACIÓN *IN VITRO* DEL POTENCIAL PROBIÓTICO DE BACTERIAS NATIVAS EN TERNEROS ROMOSINUANO..... 111

Introducción.....	113
Metodología	115
Diseño y análisis estadístico.....	118
Aislamiento de los microorganismos.....	118

Contenido

Evaluación in vitro de las características probióticas.	119
Identificación bioquímica de las bacterias nativas con potencial probiótico.	126
Identificación molecular de la cepa 12mb1 mediante amplificación y secuenciación del gen ribosomal 16s rna.	126
Conclusiones.....	130
Referencias Bibliográficas	130

CAPÍTULO 8

CARACTERÍSTICAS PROBIÓTICAS DE LEVADURAS NATIVAS AISLADAS DE VACAS LECHERAS DE RAZA GYR EN EL DEPARTAMENTO DE SUCRE	137
--	------------

Introducción.....	139
-------------------	-----

Caracterización de las propiedades probióticas in-vitro de levaduras aisladas a partir de muestras de estiércol de vacas lecheras de raza gyr.	141
Caracterización de las levaduras aisladas.	141
Características probióticas de los aislados.....	143
Identificación a nivel molecular las levaduras con potencial probiótico probadas in-vitro.....	151
Conclusiones.....	156
Referencias Bibliográficas	156

CAPÍTULO 9

EVALUACIÓN DE UN CONSORCIO DE MICROORGANISMOS CELULOLÍTICOS Y AMIOLÍTICOS EN EL COMPOSTAJE DE RESIDUOS AGROPECUARIOS DEL DEPARTAMENTO DE SUCRE	163
---	------------

Introducción.....	165
-------------------	-----

Caracterización físico-química de los residuos agropecuarios ..	166
Determinación de características físicas y químicas durante el proceso de compostaje	168
Determinación de las características físicas evaluadas al final del proceso de compostaje	177
Determinación de características químicas del compost.....	178
Conclusiones.....	185

Referencias Bibliográficas	185
CAPÍTULO 10	
EVALUACIÓN DEL POTENCIAL PROBIÓTICO DE CEPAS DE BACTERIAS Y LEVADURAS AISLADAS EN ESTIÉRCOL DE TERNEROS DE LEVANTE DE RAZA BRAHMAN EN EL DEPARTAMENTO DE SUCRE	191
Introducción.....	193
Metodología.	195
Población y muestra	195
Fase 1. Caracterización de bacterias y levaduras	195
Fase 2. Determinación de la actividad probiótica in vitro	196
Fase 3. Caracterización de bacterias con potencial probiótico ..	197
Fase 4. Diseño experimental y análisis estadístico	198
Resultados y Discusión	199
Caracterización de bacterias y levaduras	199
Determinación de la actividad probiótica in vitro de bacterias y levaduras.	202
Tolerancia a cambios de pH.....	202
Tolerancia a sales biliares	205
Tolerancia a diferentes temperaturas.....	207
Tolerancia a diferentes concentraciones de NaCl	209
Fermentación de la glucosa	210
Prueba de antagonismo	211
Capacidad de crecimiento	214
Identificación molecular por PCR.....	215
Conclusiones.....	216
Referencias Bibliográficas	216
CAPÍTULO 11	
CARACTERIZACIÓN DE BACTERIAS NATIVAS CON POTENCIAL BIOFERTILIZANTE AISLADAS DE SUELOS DEL DEPARTAMENTO DE SUCRE	221
Introducción.....	223
Metodología	225

Contenido

Aislamiento de bacterias	227
Aislamiento primario de los microorganismos	227
Aislamiento secundario	227
Cuantificación de la fijación de nitrógeno, solubilización de fosfatos y producción de auxina	228
Determinación de la actividad fijadora de nitrógeno	228
Cuantificación de la producción de ácido indol acético (AIA)...	229
Resultados y discusión	230
Aislamiento de bacterias nativas con potencial biofertilizante aisladas de suelos agrícolas.....	230
Cuantificación de la fijación de nitrógeno, solubilización de fosfatos y producción de auxina.	231
Medición del ion amonio en la determinación de la capacidad fijadora de nitrógeno.	234
Conclusiones.....	241
Referencias Bibliográficas	241

De acuerdo con La GFN (Global Footprint Network) y la NEF (New Economics Foundation), anualmente se hacen estimaciones de la velocidad con que se consumen los recursos generados en el planeta y estimaron que los recursos naturales producidos en la tierra durante un año fueron agotados en solo ocho meses. Con la disminución gradual de los recursos que el planeta provee de forma sostenible, por sobreexplotación de los recursos naturales, acumulación de carbono en la atmósfera y la imposibilidad de transformar la basura generada.

Sólo la bioeconomía, basada en la biotecnología que utiliza recurso biológico y materias primas renovables para generar mejores alimentos, con mínimos residuos puede ayudar a mitigar el daño al medio ambiente y disminuir los gastos en salud, generando a su vez ingresos y trabajo en forma sustentable. El desarrollo de biofabricas a través de Biotecnología permitirá establecer un nuevo tipo de equilibrio economía, social y ambiental. La biotecnología será una herramienta valiosa y de gran importancia el desarrollo sostenible, fortaleciendo y ayudando en la construcción de una economía basada en el conocimiento para darle valor agregado a los recursos naturales, en el bienestar individual y social, en la generación de bienes y servicios, en la sustentabilidad y la preservación de ecosistemas y de todo tipo de especie biológica

La biotecnología aplicada a la biodiversidad genética (plantas, animales y microorganismos)) como insumo para desarrollar productos agroindustriales económicamente rentables, constituye una alternativa viable que permite minimizar el impacto ambiental, mejorar la calidad de vida, en la autosuficiencia y en la adquisición, manejo y transferencia de conocimiento.

Actualmente han sido pocas las investigaciones generadas por grupos y centros de investigaciones del país, así como las alianzas estratégicas y cooperación de las instituciones generadores de conocimiento, en la

Presentación

maximización de las capacidades científicas y tecnológicas que contribuyan al conocimiento y uso de la biodiversidad para el desarrollo de la agroindustria departamental y regional. Esta nueva forma de uso de la biodiversidad, permitirá incrementar las tasas de utilización y potenciación de los recursos genéticos en agricultura, salud e industria.

CAPÍTULO 1

IMPORTANCIA DE LA BIOTECNOLOGÍA EN EL DEPARTAMENTO DE SUCRE

Eder Dadner Durango Ballesteros¹

¹ Ingeniero Agrónomo, Maestría en Biotecnología. Doctorado en Biotecnología Agrícola, mención Vegetal. Instructor Investigador en el SENA Programa SENNOVA

Introducción

El departamento de Sucre cuenta con un gran potencial en cuanto a su biodiversidad biológica, asociado a una variabilidad genética y diversidad de ecosistemas dada por unas condiciones geográficas en particular. La biotecnología como herramienta ofrece una serie de oportunidades para que las regiones de Colombia alcancen un potencial y competitividad en los sectores productivos, sin embargo el área de la biotecnología en el departamento de Sucre, está poco desarrollada, por lo que se hacen necesarios estudios para mejoras tangibles en la productividad sostenible de los sectores vitales para el crecimiento de la economía del departamento como son: la agricultura y el sector pecuario, los cuales comprenden actividades como la ganadería, el cultivo de arroz, maíz, ñame, la hortofruticultura, y la producción apícola y piscícola. Lo cual, hace necesario aumentar considerablemente los estudios de tipo biotecnológico como herramientas tecnológicas que mejoren la calidad de la explotación de los recursos naturales y promuevan la productividad de especies tanto animales como vegetales, permitiendo un aprovechamiento adecuado de los ecosistemas presentes en la región sucreña. Con lo que se podrá ampliar la capacidad local para la investigación y la innovación, diversificar la estructura productiva, generar avances tecnológicos y nuevas técnicas aplicadas a los sectores productivos tradicionales, facilitar la inserción en los mercados mundiales y fomentar la competitividad del territorio (PND, 2014).

En cifras generales, los grupos de investigación encaminados a realizar estudios biotecnológicos, son pocos en el Departamento de Sucre, lo que hace que se presente un déficit a nivel investigativo para el aprovechamiento del potencial biodiverso propio de este departamento. Según Colciencias (2016), en Sucre solo hay tres grupos reconocidos a nivel científico en el área de la biotecnología los cuales son: Biología de Microorganismos, Investigaciones Biomédicas y Biotecnología Vegetal, todos adscritos a la

Universidad de Sucre. Cifra muy baja en lo relacionado directamente con el desarrollo de investigaciones en esta área, es por esto que se hace necesario el apoyo por parte de otras universidades para enriquecer la investigación de los procesos biotecnológicos. Sin embargo, cabe resaltar que a pesar de presentar un número bajo de grupos de investigación en esta materia, en Sucre también hay grupos que desarrollan investigaciones afines, como es el caso del Grupo de Bioprospección Agropecuaria, Procesos Agroindustriales y Desarrollo Sostenible, Reproducción y Mejoramiento Genético Animal, Investigación Participativa de los Pequeños Productores de la Costa Atlántica y el Grupo de Investigación en Biodiversidad Tropical, los cuales también están adscritos a la Universidad de Sucre. Teniendo en cuenta lo anterior, es posible afirmar que hay un déficit investigativo en el área biotecnológica lo que plasma una necesidad de conformar un mayor número de grupos de investigación que permitan realizar más estudios directamente enmarcados en esta área del conocimiento.

Con base en lo anterior, la Corporación Universitaria del Caribe (CECAR) y la Gobernación de Sucre han promovido estudios en los que se han identificado las problemáticas que generan más impacto en el departamento que afectan directamente a los sectores en los cuales se podrían aplicar los conocimientos en el área de la Biotecnología (Ver Tabla 1).

Tabla 1. *Interrelaciones entre los principales problemas, impactos esperados y requerimientos de formación de alto nivel en el Sector Agropecuario y Agroindustrial de Sucre*

Los Principales requerimientos de formación de alto nivel	Valor
Conservación de suelos y aguas	5,0
Manejo integrado de cultivos	5,0
Ciencias veterinarias	5,0
Ciclo de vida y trazabilidad producción. Origen animal	5,0
Recuperación de suelos contaminados	4,9
Ciencias del suelo aplicadas a agricultura	4,8
Acuicultura	4,8
Epidemiología animal y salud pública	4,8
Ingeniería avanzada de alimentos	4,7
Gestión de plantas agroindustriales	4,6

Los Principales requerimientos de formación de alto nivel	Valor
Ing. transformación industrial de cárnicos	4,6
Ingeniería de la producción de lácteos	4,6
Ciclo de vida y trazabilidad pr. Agroindustriales	4,6
Industria pesquera	4,6
Principales impactos esperados de un programa de formación de alto nivel	Valor
Actividades continuas sin suspensión por falta de agua	4,6
El producto es aceptable en todos los mercados	4,6
Cadenas o clusters con nacionales funcionando	4,6
Incremento de la productividad	4,5
Actividades continuas en el lugar con protección de suelos	4,5
Cadenas o clusters con extranjeros funcionando	4,5
Alianzas estratégicas comerciales	4,5
Mayor eficiencia en el uso del agua	4,5
Mayor eficacia	4,3
Principales problemas del sector	Valor
Carreteras e infraestructuras asociadas	4,8
Utilizar tecnologías modernas	4,7
Capacidad para innovar en procesos	4,7
Cumplir normas sobre el uso del agua	4,7
Alianzas estratégicas comerciales	4,5
Manejar y mejorar tecnologías de proceso	4,5
Alianzas estratégicas para Idi	4,5
Cumplir normas de calidad	4,4
Acceso a fuentes naturales de agua	4,4
Apoyar / desarrollar estrategias para reducir la pobreza	4,4
Capacidad para proteger los suelos	4,4

Fuente: Matamoros, M., 2013. *Formación de alto nivel para cerrar brechas. Identificación de prioridades a partir del análisis de problemas e impactos esperados.*

Citado por PEOCTI Sucre. 2013

Teniendo en cuenta la anterior información, la biotecnología puede aplicarse en el sector agropecuario, principalmente orientados a solucionar problemáticas en lo relacionado con la remediación de suelos, manejo

integrado de los cultivos, las ciencias veterinarias y la acuicultura, El gran potencial por explorar del departamento de Sucre, el cual se refleja en las siguientes cifras: El departamento de Sucre cuenta con 886.389 hectáreas en suelos aptos para usos agropecuarios, equivalentes al 81,2 % de la superficie total del departamento, de las cuales el 42 por ciento está siendo sobreutilizado por los agricultores con cultivos de yuca, maíz, plátano, arroz, ñame y algodón, siendo más marcada esta actividad en los municipios de Sincé, Corozal, los Palmitos, Buenavista, la Unión, San Juan de Betulia, San Pedro y Majagual, utilizando tierras con vocación para otras actividades o definidas como áreas de protección ambiental, el 36 por ciento esta subutilizado, actividad asociada a la ganadería marcándose más este fenómeno en los municipios de San Onofre, San Benito Abad, San Marcos y Tolú. (IGAC. 2014). Tradicionalmente la estructura productiva del Departamento ha sido predominantemente agropecuaria, pero en las últimas dos décadas este sector ha experimentado bajas importantes, manifestándose dentro del total del PIB. (PRG, 2015).

En el departamento de Sucre, el sector agrícola se presentan fortalezas y debilidades a nivel de algunos productos con respecto a la producción nacional, lo que se convierte en un campo de acción directa para la Biotecnología, pudiendo desde esta área realizar aportes para sostener la producción agrícola incidiendo directamente con la mejora de las practicas tecnológicas en cuanto a producción y aprovechamiento sostenible de los recursos naturales del departamento, mejorando el manejo de las cosechas, a través del desarrollo de bioinsumos que brinden la posibilidad de tener un aprovechamiento más limpio del suelo con el uso de abonos orgánicos, bioproductos enfocados a la mejora de la producción de estos cultivos a nivel industrial, bioprocesos que permitan el uso de células vivas para la mejora de procesos dentro de la producción agrícola, bioremediación utilizando organismos o microorganismos que permitan la mejora de las condiciones del agua y suelo en las áreas donde se practica la agricultura de manera intensiva.

El creciente interés en los últimos años por el uso de compuestos y productos orgánicos biológicamente activos, obtenidos de microorganismos y plantas, así como especies mejoradas con o sin transformación genética, representan la capacidad de disminuir el impacto ambiental e incrementar la competitividad del departamento y de la región, brindando productos

menos contaminados y más inocuos con capacidad de competir en mercados internacionales.

La gravedad de estos problemas demanda un cambio urgente de manejo agropecuario. El reto de la Región Caribe es vincular la biodiversidad y convertir el conocimiento proveniente del estudio de los recursos naturales (fitogenéticos, zoogenéticos, microbiológicos y fúngicos), diversidad biológica aprovechable y explotable de manera sostenible en beneficio de la sociedad y la sostenibilidad del planeta. Para ello es necesario desarrollar nuevas alternativas que contribuyan con el desarrollo agrosostenible y agroindustrial, a través de un manejo integrado que propicien el equilibrio entre el hombre y la naturaleza adoptando un sistema de producción que permita mejorar la calidad de los suelos y obtener productos limpios para el consumo humano.

Referencias Bibliográficas

- Fals O. (2002). Resistencia en el San Jorge, Historia doble de la Costa 3, Segunda edición, Universidad Nacional de Colombia, Banco de la República, El Áncora Editores, Bogotá. p. 388.
- GFN (Global Footprint Network). (2015). Las estrategias de recursos para el éxito económico. Consultado en <http://www.footprintnetwork.org/es/>. Julio 15 de 2015.
- IGAC (Instituto Geográfico Agustín Codazzi). (2014). Anti ranking de los departamentos con los mayores conflictos de los suelos en Colombia. Oficina de comunicación y prensa. 5p
- Marco E. (1962). “Cartagena de Indias: Riquezas ganaderas y problemas”, Congreso Hispanoamericano de Historia realizado en Cartagena.
- MinCIT (Ministerios de Comercio E industria y Turismo). (2013). Informe técnico Departamento de Sucre. Oficina de estudios económicos. 31p.
- NEF (New Economics Foundation). (2015). Food & Agriculture. Consultado en <http://www.neweconomics.org/>. Julio 15 de 2015.
- PLAN ESTRATÉGICO DEPARTAMENTAL DE CIENCIA TECNOLOGÍA E INNOVACIÓN EN SUCRE, 2013
- PLAN NACIONAL DE DESARROLLO, 2010-2014
- PLAN REGIONAL DE COMPETITIVIDAD, 2009

UNGRD (2012). Unidad Nacional para la Gestión del Riesgo, Plan departamental de gestión del riesgo Sucre. Proyecto PNUD-UNGRD, financiado por la Unión Europea.

Wiseman A. (1986). Principios de Biotecnología, Acribia, Zaragoza.

CAPÍTULO 2

MICROPROPAGACIÓN DE ÑAME ESPINO (*Dioscorea rotundata*, POIR), CULTIVAR BOTÓN EN SISTEMA DE CULTIVO DOBLE FASE

Lucía Candelaria Díaz Narváez²
Heberto Polanco Ortega³
Oscar Elías Carmona Wilches⁴
Eder Dadner Durango Ballesteros⁵
Javier Darío Beltrán Herrera⁶
Isidro Elías Suárez Padrón⁷

2 Biólogo. Maestría en Biotecnología.

3 Biólogo. Maestría en Biotecnología.

4 Biólogo. Maestría en Biotecnología.

5 Ingeniero Agrónomo, Maestría en Biotecnología. Doctorado en Biotecnología Agrícola, mención Vegetal. Instructor Investigador en el SENA Programa SENNOVA

6 Biólogo, Maestría en Biología Molecular de Plantas Tropicales y Doctorado en Fitopatología. Profesor de la Universidad de Sucre.

7 Ingeniero Agrónomo, Doctor en Ciencias Hortícolas. Docente Universidad de Córdoba

Introducción

El ñame espino (*Dioscorea rotundata*) es una de las 650 especies pertenecientes al género *Dioscorea*, ampliamente distribuidas en regiones tropicales de alta pluviosidad, donde exhibe su mayor diversidad, consolidándose como el grupo principal de plantas con flores de esta familia (Thurston, 1998). Es originario de África occidental y actualmente distribuido por todos los trópicos. Esta especie no se conoce en estado silvestre y se cree que derivó de *D. cayenensis*, de la misma región. Las plantas pertenecientes a esta especie se caracterizan por poseer tubérculos llamados ñames, los cuales son una estructura del tallo modificado, cuya función es el almacenamiento de gránulos de almidón (Tejeda et al., 2007).

En Colombia, las especies más cultivadas son *Dioscorea alata* o ñame criollo y *D. rotundata* o ñame espino, donde el 92% de la producción nacional se concentra en los departamentos de Sucre, Córdoba y Bolívar (Campo, 2011; Reina, 2012; Agronet, 2016). El ñame espino, por su parte, es un cultivo de pequeños y medianos agricultores de la Costa Caribe, el cual constituye la principal fuente de ingresos, de empleo rural, oferta de alimento para sus pobladores y un producto de exportación (Tejeda et al., 2007; Reina, 2012).

El departamento de Sucre genera el 20% de la producción de ñame de la Costa Caribe, ocupando el tercer lugar después de Bolívar y Córdoba (Agronet, 2014). En este departamento el ñame es el principal producto de la canasta familiar y sustento de pequeños productores, donde el 47% de la producción total es de ñame espino (Reina, 2012). En el 2010 se reportó en Sucre una producción de 13.020 toneladas (ton) de ñame espino, siendo Los Palmitos el principal municipio productor (4.680 ton), seguido de Ovejas (4.560 ton), Sampués (1.000 ton), Tolúviejo y Sincé (337 ton), en total para el 2010 se cultivaron 1.269 hectáreas (ha) y se cosecharon 1.260 ha en todo el departamento. Es importante resaltar que el municipio de Los palmitos registra rendimientos por hectáreas del cultivo entre 14 y

18 ton, y algunos productores han incrementado su densidad de siembra hasta 15.000 plantas ha⁻¹ alcanzando un rendimiento de hasta 26 ton (Fundación Procaribe, 2012).

Adicionalmente, el cultivo de ñame espinoso (*Dioscorea rotundata*) se ha posicionado como un producto de exportación en los mercados de Estados Unidos y Europa generándole al país más de US\$2.5 millones anuales (Sánchez y Hernández, 2003; Fundación Procaribe, 2012; Plan General de Asistencia Técnica Municipio de Chalán, (2013) siendo a nivel nacional la especie que más genera ingresos de exportación (40 millones de pesos por cada contenedor de 22, 8 ton) (ICA, 2009).

No obstante, el desarrollo extensivo de este cultivo se ha visto limitado, principalmente por dos razones: (i) bajas tasas de multiplicación en campo del material vegetal de plantación (tubérculo), y (ii) alta susceptibilidad del cultivo frente a enfermedades causadas por virus, bacterias, nematodos y en especial hongos como *Colletotrichum gloeosporioides* (Salazar y Beltrán, 2002; Reina, 2012). Además, el riesgo de transmisión de enfermedades de un ciclo a otro y de una localidad a otra se incrementa debido a la propagación vegetativa del cultivo a través del fraccionamiento de los tubérculos (Amusa, Adegbite, Muhammed y Baiyewu, 2003). A esto, se suma la estacionalidad del cultivo, cuya siembra normalmente inicia entre abril y mayo (Rodríguez, 2015; Fundación Procaribe, 2012), originando escases de material de siembra e incrementa sus costos durante ese período. En ese sentido, para el cultivo de ñame, la poca disponibilidad de material de siembra se presenta como la principal problemática a solucionar hacia un desarrollo eficiente del cultivo del ñame (Yan et al., 2011).

Es así como la propagación in vitro surge como una excelente alternativa, pues permite la producción de plantas genéticamente homogéneas, la utilización de propágulos de pequeño tamaño, independencia de la estacionalidad, sanidad del material vegetal y manipulación de una tasa elevada de explantes en espacio reducido (Vidoy, 2014). Sin embargo, la micropropagación por segmentos nodales más extendida en especies vegetales, especialmente en plantas del género *Dioscorea* se realiza en matrices de cultivo semisólido (SS) (Borges et al., 2011; Bonilla y Hernández, 2012; Senapati et al., 2015). Además, los protocolos para la propagación in vitro de ñame bajo matrices (SS) han presentado bajos coeficientes de

multiplicación y supervivencia de las plantas en la fase de aclimatación y en campo (Medero et al., 1999; Chu y Figueredo, 2002; Borges et al., 2004).

Una alternativa para obtener una mayor eficiencia en la propagación *in vitro*, y a su vez disminuir los costos de producción y mano de obra, se ha desarrollado en diferentes especies vegetales, donde implementan un sistema de cultivo doble fase (DF), el cual consiste en una capa de medio semisólido superpuesta por una capa de medio líquido, que le brinda soporte al explante previniendo problemas como la hiperhidricidad (Ziv, 1995; Domingues et al., 2013; Senapati, 2015), y a su vez brinda las ventajas del medio líquido tales como; mayor disponibilidad de agua y nutrientes, reducción en los gradientes de nutrientes y hormonas endógenas, eliminación de la polaridad y reducción en el efecto de las toxinas (Singha 1982, citado por Ávila et al., 1996; Debergh, 1983; Gawel y Robacker 1990; Ascough y Fennell, 2004). Se debe considerar que la micropropagación de especies vegetales en sistema de cultivo (DF) no requiere la realización de subcultivos periódicos, con lo cual es posible reducir los riesgos de contaminación por manipulación y los costos de producción debido a la reducción en insumos y mano de obra (Senapati, 2015), razones por la cual esta investigación tuvo como objetivo desarrollar un protocolo de micropropagación para la especie *D. rotundata* cultivar Botón en sistema de cultivo (DF) para la producción de material de siembra de excelente calidad fisiológica y fitosanitaria del cultivo.

Metodología

Ubicación Geográfica: esta investigación se realizó en el Laboratorio de Biotecnología Vegetal de la Universidad de Sucre, sede Puerta Roja en la ciudad de Sincelejo.

Obtención del Material Vegetal: las plántulas necesarias para el desarrollo de esta investigación fueron obtenidas a través de subcultivos periódicos cada tres meses de la accesión codificada como 010 (*D. rotundata*, cultivar Botón) perteneciente al Banco de Germoplasma de Ñame de la Universidad de Sucre. Como explante se utilizaron segmentos con al menos dos nudos, con hojas y sin raíces, a razón de tres explantes por frasco (182 cm³).

El medio de cultivo estuvo constituido por sales Murashige y Skoog al $4,33 \text{ g L}^{-1}$, sacarosa 30 g L^{-1} , tiamina 1 mg L^{-1} , mioinositol $0,1 \text{ g L}^{-1}$, y agar $5,5 \text{ g L}^{-1}$. Todos los medios de cultivo se ajustaron a un pH de 5.8 ± 0.1 y fueron esterilizados por 20 minutos a 15 psi y 121°C , tras lo cual fueron observados durante 7 días, antes de su uso, para descartar cualquier contaminación. La incubación de las plántulas se realizó a una temperatura $25 \pm 5^{\circ}\text{C}$, humedad relativa de 65% y un fotoperiodo de 12 horas luz con una intensidad lumínica de $50 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$.

Comparación del desarrollo in vitro de la especie D. rotundata, cv. Botón en el sistema de cultivo convencional y doble fase a través del tiempo.

En este experimento se utilizaron segmentos uninodales con una longitud aproximada de 1,5 cm, tomados de plantas de 60 días de edad micropropagadas sin la implementación de reguladores de crecimiento e incubadas bajo las condiciones descritas anteriormente. El material vegetal se estableció en medios de cultivo, a razón de un segmento nodal por recipiente (240 cm^3).

En cada uno de los recipientes se depositaron 30 ml de medio de cultivo. El cual estuvo constituido por sales MS $4,33 \text{ g L}^{-1}$, sacarosa 30 g L^{-1} , tiamina 1 mg L^{-1} , mio-inositol 100 mg L^{-1} , ANA $0,1 \text{ mg L}^{-1}$, BAP $0,3 \text{ mg L}^{-1}$ y agar $6,0 \text{ g L}^{-1}$. Además, Para el sistema de cultivo doble fase se adicionaron 10 ml de medio de cultivo líquido con la misma formulación que el medio de cultivo semisólido, tres días después del establecimiento de los explantes.

Los segmentos uninodales estuvieron provistos de una hoja y sin raíces. Los cuales, fueron establecidos en los distintos sistemas a razón de un explante por recipiente obedeciendo a la polaridad de la planta, las cuales fueron incubadas a una temperatura de $25 \pm 5^{\circ}\text{C}$, humedad relativa de 65%, una intensidad lumínica de $50 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ y un fotoperiodo de 12 horas luz.

Además, las plántulas de D. rotundata, cultivar Botón, incubadas en los dos sistemas de cultivo bajo las condiciones anteriormente mencionadas, fueron trasplantadas a condiciones de casa malla al cabo de 30, 60 y 90 días

en bandejas plásticas con 18 alveolos con un sustrato comercial (Ergo®), en cada uno de los cuales, se transfirió una plántula por alvéolo.

Bajo condiciones de casa malla se empleó un polisombra del 60% de cobertura y una frecuencia de riego por nebulización de 30 segundos cada media hora. Después de la primera semana las plantas se irrigaron con una frecuencia de 12 segundos cada dos horas, y a partir de la cuarta semana las plantas fueron sometidas a una frecuencia de dos riegos diarios de 3 minutos cada uno, cada 12 horas (Suárez et al., 2009).

Evaluación del desarrollo in vitro de la especie *D. rotundata*, cv. Botón en el sistema de cultivo convencional y doble fase a través del tiempo.

A los 30, 60 y 90 días de haber iniciado el experimento de multiplicación en ambos sistemas de cultivo, se midieron las siguientes variables:

- Longitud del tallo (en centímetros, desde la base del tallo hasta el último nudo) (Domínguez et al., 2013)
- Número de nudos (Borges et al., 2004)
- Número de hojas (Borges et al., 2011)
- Número de raíces (Scherwinski et al., 2012)
- Densidad estomática (número de estomas por mm²) y número de estomas abiertos.
- Densidad de tricomas (número de tricomas por mm²)

Se realizaron observaciones histológicas de la parte foliar a través de cortes paradérmicos de hojas de *D. rotundata* provenientes de cada sistema de cultivo.

Al final de la sexta semana, se registró el porcentaje de supervivencia (número de plantas vivas sobre el número total de plantas evaluadas por cien) (Díaz et al., 2015).

Diseño y análisis estadístico.

La investigación se realizó bajo un diseño completamente al azar (DCA), formado por seis tratamientos con nueve réplicas cada uno. A los datos obtenidos se les aplicó las pruebas de normalidad (Shapiro-Wilk) y homogeneidad de varianzas (Bartlett), tras lo cual, se concluyó que las variables se distribuían de forma normal y homogénea. Por lo tanto, se utilizaron las pruebas paramétricas de Tukey y Tstudent. Todos los análisis estadísticos se procesaron en el programa R para Windows, versión 3.4.3 con los paquetes agricolae y stats (Mendiburu, 2016; R Core Team, 2017).

Comparación del desarrollo in vitro de la especie D. rotundata, cultivar Botón en sistema de cultivo convencional y sistema de cultivo doble fase a través del tiempo.

Según Borges et al. (2011), los indicadores fundamentales en la micropropagación de ñame son la longitud del vástago y el número de nudos. El desarrollo de nudos nuevos depende del sistema de cultivo implementado (Tabla1), mostrando resultados superiores en el sistema de cultivo (DF). Asimismo, se evidenció la influencia del tiempo dentro de este sistema, donde se alcanzó el mayor número de nudos (22,44) a los 90 días de cultivo (figura1A), sin embargo, no existen diferencias estadísticas con el valor alcanzado a los 60 días de cultivo (18,22) (Tabla1).

Tabla 1. Efecto del tiempo y el sistema de cultivo sobre la longitud del tallo y el número de nudos de Dioscorea rotundata, cv Botón bajo condiciones in vitro.

Tiempo (Días)	Longitud del Tallo		Número de nudos	
	Sistema SS	Sistema DF	Sistema SS	Sistema DF
30	4,02Ab	5,49Ba	5,89Ab	10,22Ba
60	5,60Ab	6,72ABa	8,89Ab	18,22ABa
90	5,14Ab	8,17Aa	8,67Ab	22,44Aa

Letras mayúsculas representan diferencias significativas entre los tres periodos de tiempo indicados para cada matriz según prueba de comparación de medias Tukey para $p < 0,05$, y letras minúsculas representan diferencias significativas entre sistemas de cultivo para cada periodo de tiempo según prueba de T-Student para $p < 0,05$.

En este sentido, se pudo observar que, independiente del tiempo de cultivo implementado en el sistema semisólido (SS), los resultados fueron estadísticamente no significativos para la variable número de nudos en

los tres periodos de tiempo. Resultados similares fueron obtenidos para la variable longitud del vástago en la cual se obtuvo la mayor longitud del tallo en el sistema de cultivo (DF) a los 90 días de cultivo (8,17 cm) (Figura 1), no existiendo diferencias significativas con la longitud del tallo obtenida a los 60 días de cultivo (6,72 cm). No obstante, en el sistema de cultivo convencional (SS), no hubo diferencias estadísticas para la variable a través del tiempo (figura1B) (Tabla1).

Los resultados anteriores concuerdan con los reportados por Scherwinski et al. (2012), quienes encontraron los valores más altos en las variables longitud del brote y número de nudos de piña (*Ananas comosus* L.) al incubar las plántulas en sistema de cultivo (DF) durante cinco meses. Obteniendo así, una tasa promedio de proliferación de brotes un 58% superior con respecto al sistema de cultivo convencional (SS). Del mismo modo, Senapati (2015) reportó una tasa de multiplicación de brotes (98,7 %) y longitud de brotes (9,9 cm) mayor en sistema de cultivo DF con respecto al sistema de cultivo SS en la propagación in vitro de *Rauwolfia serpentine* L.



Figura 1. Plántulas de *Dioscorea rotundata* Poir. cv. Botón a los 90 días de cultivo. A. Sistema de cultivo doble fase (DF). B. Sistema de cultivo semisólido (SS).

En este orden de ideas, se debe apreciar que el crecimiento de las plántulas tiende a ser mayor en sistemas de cultivo (DF) con relación al

presentado en sistemas de cultivo convencional (SS), lo cual se debe a que en este nuevo sistema se aprovechan las ventajas de las matrices sólidas y líquidas. De esta manera, la utilización de una capa de medio líquido en el sistema de cultivo proporciona las siguientes ventajas: i) incrementa la disponibilidad de agua y nutrientes disueltos en el medio de cultivo (Singha 1982, citado por Ávila et al., 1996; Debergh 1983), ii) reduce los gradientes de nutrientes y hormonas endógenas (Gawel y Robacker 1990), iii) elimina la polaridad, y iv) disminuye el efecto de las toxinas sobre el tejido vegetal (Ascough y Fennell, 2004).

Por otra parte, al emplear una matriz de cultivo sólida en la parte basal del sistema doble fase garantiza: i) soporte al explante, y ii) previene el efecto depresivo sobre el crecimiento y desarrollo de los tejidos vegetales debido a la hipoxia (baja disponibilidad de oxígeno) o la hiperhidricidad, las cuales pueden generar desórdenes fisiológicos, como la malformación de hojas y tallos (Ziv, 1995), las cuales se constituyen las principales desventajas de utilizar medio de cultivo líquido para la micropropagación de especies vegetales (Preil, 2005; Ziv, 2005; Cabrera, 2009).

Tabla 2. Efecto del tiempo y el sistema de cultivo sobre el número de raíces y número de hojas de *Dioscorea rotundata*, cv. Botón bajo condiciones in vitro.

Tiempo (Días)	Número de raíces		Número de hojas	
	Sistema SS	Sistema DF	Sistema SS	Sistema DF
30	6,78Ab	9,67Aa	6,78Ab	9,67Aa
60	10,44Aa	9,44Aa	10,44Aa	9,44Aa
90	9,00Ab	13,12Aa	9,00Ab	13,12Aa

Letras mayúsculas representan diferencias significativas entre los tres periodos de tiempo indicados para cada matriz según prueba de comparación de medias Tukey para $p < 0,05$, y letras minúsculas representan diferencias significativas entre sistemas de cultivo para cada periodo de tiempo según prueba de T-Student para $p < 0,05$.

Con respecto al desarrollo radicular, los resultados evidenciaron la influencia del sistema de cultivo sobre la producción de raíces in vitro en *Dioscorea rotundata*, es así como el número de raíces fue significativamente superior en el sistema de cultivo (DF) en dos de los tres periodos de tiempo 30 y 90 días (tabla 2). Asimismo, a partir de los resultados se pudo constatar que el tiempo de cultivo no tuvo influencia significativa ($p > 0,05$) en el desarrollo radicular dentro de ambos sistemas, no obstante, los resultados

obtenidos en esta investigación no coinciden con los reportados por Senapati (2015), quien encontró que el número de las raíces de *R. serpentine* fue significativamente superior en sistema de cultivo (DF) al compararlo con los resultados obtenidos en sistema de cultivo convencional, demostrando así que el desarrollo radicular de una especie es genotipo dependiente.

Por otra parte, se debe considerar que es posible reducir el tiempo y los costos de producción durante la micropropagación de *D. rotundata*, cv. Botón en sistema de cultivo (DF), puesto que no es necesario realizar una fase de enraizamiento después de la fase de multiplicación, gracias al buen desarrollo radicular de las plántulas.

Resultados similares fueron reportados por Borges et al. (2011) quienes afirmaron que es posible realizar de forma simultánea las fases de multiplicación y enraizamiento en *D. alata*, reduciendo así el tiempo de micropropagación de la especie, los costos asociados a la fase de enraizamiento y la pérdida de plántulas por contaminación. No obstante, los resultados obtenidos en este ensayo superan a los obtenidos en la investigación antes mencionada, para las variables indicadoras de crecimiento y desarrollo.

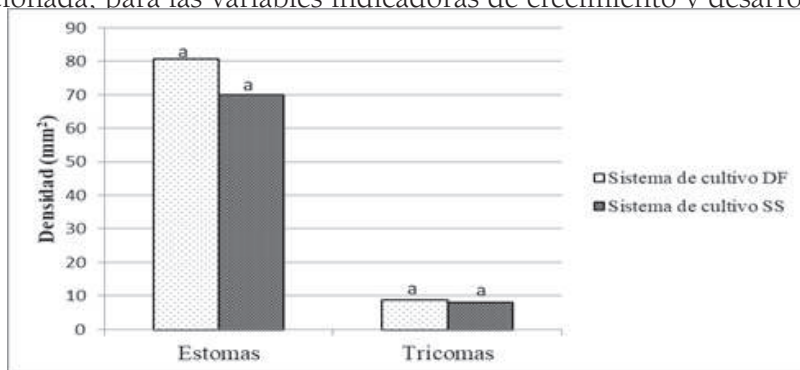


Figura 2. Evaluación in vitro de la densidad de tricomas y la densidad estomática de *D. rotundata* cv. Botón en sistema de cultivo doble fase (DF) y sistema de cultivo semisólido (SS).

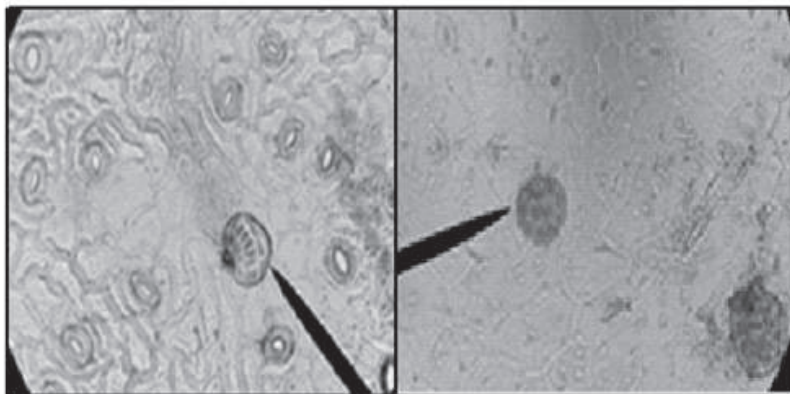


Figura 3. Observación de estomas 40x (A) y tricomas 10x (B) a partir de cortes paradérmicos de hojas de *D. rotundata* cv, Botón en sistema de cultivo doble fase, teñidos con Safranina. (Fuente de elaboración propia) .

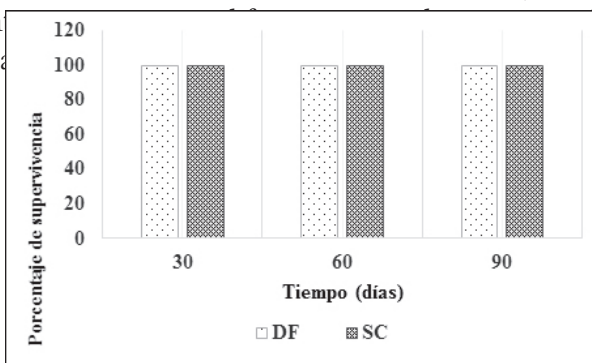
Por otra parte, el desarrollo foliar estuvo influenciado por el sistema de cultivo en el cual se encontraban los explantes, obteniendo un promedio significativamente superior en el número de hojas en el sistema de cultivo doble fase a los 30 y 90 días de incubación. Sin embargo, no se observaron diferencias estadísticas entre los sistemas de cultivo a los 60 días de incubación (tabla 2). Además, se realizaron cortes histológicos (paradérmicos) de las hojas de *D. rotundata*, cultivadas bajo ambos sistemas, y se encontró que la densidad estomática (número de estomas/mm²) fue similar en ambos sistemas (Figura 2), dichas estructuras se encontraban abiertas en su totalidad (Figura 3). Así mismo, no se evidenciaron diferencias estadísticas entre los sistemas de cultivo al evaluar la densidad de tricomas (número de tricomas/mm²), (Figura 2).

Los resultados obtenidos con respecto a la densidad estomática concuerdan con lo reportado por Marín, Vargas y Oropeza (2012), quienes encontraron presencia de estomas en hojas de *Dioscorea alata* provenientes de cultivo in vitro, además reportan que no existe diferencias significativas en el tamaño de las estomas de plantas de esta especie cultivadas en condiciones in vivo con respecto a las micropropagadas. Lo cual, evidencia que las plantas mantenidas in vitro responden a las condiciones ambientales

del cultivo y, por lo tanto, reversion al fenotipo de la planta madre crecida in vivo, cuando pasan por un proceso de aclimatación, entonces se pone en evidencia la plasticidad fenotípica de la especie vegetal en estudio (Marín et al., 2012).

Lo anterior, permite argumentar que el buen desarrollo de estomas y tricomas de las plantas cultivadas en los dos sistemas promovieron una buena climatización de estas plantas bajo condiciones de casa malla.

Con relación al efecto ejercido por el tiempo dentro de cada sistema de cultivo sobre el desarrollo de hojas se observó que dicho efecto fue nulo, por tanto, no se observó diferencias significativas entre los periodos de tiempo evaluados.



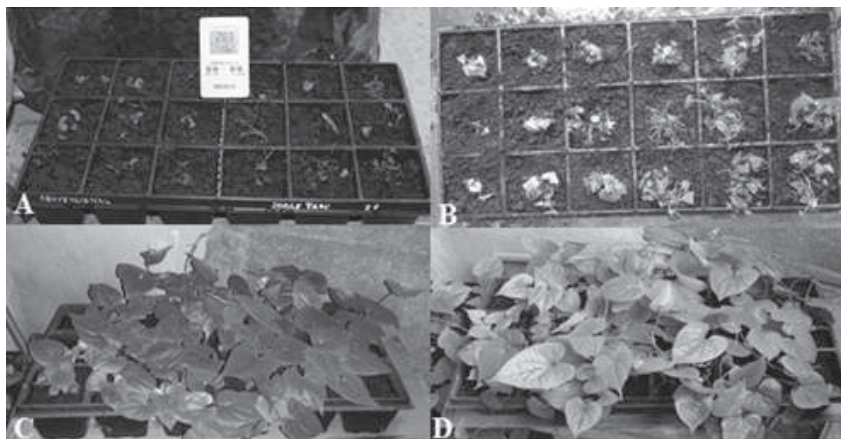


Figura 4. Evaluación del porcentaje de supervivencia ex vitro de *Dioscorea rotundata* cv, Botón en sistema de cultivo doble fase (DF) y sistema de cultivo semisólido (SS).

Figura 5. Plántulas de *D. rotundata* cv. Botón proveniente de los sistemas de cultivo SS y DF, transferidas a condiciones ex vitro. A. plantas de 90 días de micropropagación en el primer día en condiciones ambientales. B. Material vegetal 20 días después de su cultivo ex vitro. C. Plantas climatizadas de 50 días de edad. D. Plantas climatizadas de 60 días en condiciones ex vitro.

Fuente: elaboración propia

Del mismo modo, se logró constatar que el buen desarrollo radicular sumado al buen desarrollo anatómico y fisiológico de las estructuras aéreas de las plántulas pudo haber favorecido los altos porcentajes de supervivencia (100%) (Figura 4), observados al climatizar las plántulas en casa malla, razón por la cual el sistema de cultivo y el tiempo de incubación de estas no afectó su supervivencia durante esta fase de la micropropagación (Figura 5).

Conclusiones

La implementación del sistema de cultivo doble fase para la propagación in vitro de *D. rotundata*, cv. Botón, permitió aumentar el crecimiento y desarrollo de plantas in vitro, a la vez que se reduce el tiempo y los costos de producción del material. Convirtiéndose en el primer reporte de un sistema altamente promisorio y de bajo costo para la producción de

material de siembra de buena calidad para la especie, el cual podría servir como base al implementarlo en otros ejemplares comerciales del género *Dioscorea*.

Referencias Bibliográficas

- Acosta, R. y Beltrán, J. (2000). Estandarización de la técnica de micropropagación para la obtención masiva de plantas de ñame espino (*D. rotundata*) mediante el cultivo in vitro de segmentos nodales. (Tesis de pregrado). Universidad de Sucre. Sincelejo.
- Agronet. (2014). Anuario estadístico del sector agropecuario 2013. ISSN: 2346-4089.
- Agronet. _____ (2016). Recuperado de: <http://www.agronet.gov.co/estadistica/Paginas/default.aspx>
- Amusa, N., Adegbite, A., Muhammed, S. y Baiyewu, R. (2003). Yam diseases and its management in Nigeria. *Afr. J. Biotechnol*, 2(12), 497-502.
- Ascough, G. y Fennell, C. (2004). The regulation of plant growth and development in liquid culture. *S. Afr. J. Bot*, 70(2), 181-190.
- Bonilla, M. y Hernández, O. (2012). Propagación in vitro de ñame (*Dioscorea* spp.): Una perspectiva en la producción masiva de plántulas y conservación de germoplasma. *Agron*, 20(2), 65-76p.
- Borges, M., Destrade, R., Rodríguez, S., Kosky, R., Malaurie, Hamon, P. Y Demenorval, L. (2011). Optimización de un medio de cultivo para plantas micropropagadas de *Dioscorea alata* L. *Rev. Col. Biot*, 13(2), 221-228p.
- Borges, M., Meneses, S., Aguilera, N. y Vazquez, J. (2004). Regeneration and multiplication of *Dioscorea alata* germplasm maintained in vitro. *Plant Cell Tissue Organ Cult*, 76, 87-89.
- Cabrera, M. (2009). Empleo de métodos biotecnológicos para la propagación de ñame. *Biot. Veg*, 9(4), 195-209.
- Campo, R. (2011). Manejo integrado de la antracnosis (*colletotrichum* spp.) en ñame (*Dioscorea alata*), mediante el uso de alternativas para reducir el inóculo primario, la dispersión y el establecimiento del patógeno. Recuperado el 7 de junio de 2016. Recuperado de: <http://web.www3.unicordoba.edu.co/sites/default/files/Infor->

me%20Final%20FCA%2003-08%20Rodrigo%20Campo%20Ara-
na.pdf

- Chu, E. y Figuereido, R. (2002). Growth and carbohydrate changes in shoot cultures of *Dioscorea* species as influenced by photoperiod, exogenous sucrose and cytokinin concentrations. *Plant. Cell. Tissue. Organ. Cult.* 70(1), 241-249.
- Debergh, P. (1983). Effects of agar brand and concentration on the tissue culture medium. *Physiol. Plant*, 59(1), 270-276.
- Díaz, L., Carmona, O., y Beltrán, J. (2015). Optimización de la conservación in vitro de germoplasma de *Dioscorea* spp por crecimiento mínimo. *Rev. colomb. Biotecnol.* 17(1), 32-39.
- Domínguez, Sh., Meneses, R., Aparecida, T. y Scherwinski, J. (2013). A new procedure for in vitro propagation of vanilla (*Vanilla planifolia*) using a double-phase culture system. *Sci Hortic*, 161, 204-209.
- Fundación PROCARIBE. (2012). Guía práctica para el manejo orgánico de cultivo de ñame tipo exportación. Recuperado el 15 de agosto 2016. Recuperado de: https://issuu.com/swissaid-ko/docs/cartilla_ame_julio_2012
- Gawel, N. y Robacker, C. (1990). Somatic embryogenesis in two *Gossypium hirsutum* genotypes on semisolid versus liquid proliferation media. *Plant. Cell. Tissue. Org. Cult.* 23(1), 201-204.
- Instituto Colombiano Agropecuario (ICA). (2009). Exportadores de ñame de la mano del ICA. Recuperado el 25 de junio de 2016. Recuperado de: <http://www.ica.gov.co/Noticias/Agricola/2009/Exportadores-de-name-de-la-mano-del-ICA.aspx>
- Marín, E., Vargas, T. y Oropeza, M. (2012). Variabilidad genética y anatomía foliar comparada de plantas de *Dioscorea alata* mantenidas en cultivo in vitro. *Interciencias*, 37(6), 477-483.
- Medero, V., Del Sol, L., García, M., López, J. y Rodríguez, S. (1999). Metodología para la propagación del clon de ñame “Blanco o Pelú”. *Resúmenes de BIOCAT99*, Granma Cuba, pp. 12.
- Mendiburu, F. (2016). *Agricolae: Statistical Procedures for Agricultural Research*. R package version 1.2-4. <http://CRAN.R-project.org/package=agricolae>

- Plan General de Asistencia Técnica Municipio de Chalán. (2013). Recuperado de: <http://chalan-sucre.gov.co/apc-aa-files/66313336653063613665666139613230/documento-plan-general-de-asistencia-tecnica-pgat.pdf>
- Preil, W. (2005). General introduction: a personal reflection on the use of liquid media for in vitro culture. En: A. Hvostlef-Eide., y W, Preil (Ed.), *Liquid Culture Systems for in vitro Plant Propagation* (pp. 1-18). Ahrensburg, Germany: Springer.
- R core team. (2017). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. Recuperado de: <https://www.R-project.org/>.
- Reina, Y. (2012). El cultivo de ñame en el Caribe colombiano. Documentos de trabajo sobre economía regional. Banco de la Republica sucursal Cartagena. 1(168), 31. ISSN 1692-3715.
- Rodríguez, D. (2015). Obtención de minitubérculos de ñame (*Dioscorea rotundata* Poir) cv. ‘Blanco de Guinea’ a partir de plantas in vitro y su respuesta en campo. (Tesis de Maestría). Biotecnología Vegetal. Universidad Central “Marta Abreu” de las Villas. Santa Clara.
- Salazar, R. y Beltrán, J. (2002). Microtuberización en ñame (*Dioscorea alata* L.) var. “Pico de botella”. *Rev. colomb. biotecnol.* 4(2), 27-32.
- Sánchez, C. y Hernández, L. (2003). Descripción de aspectos productivos, de postcosecha y de comercialización del ñame en Córdoba, Sucre y Bolívar. *Corpoica*.
- Scherwinski, J., Araruna, E., Da silva, T., Gomes, A., Maciel, S. y da Silva, F. (2012). Double-phase culture system for large scale production of pineapple. *Plant. cell. tiss. organ. cult.* 109, 263-269.
- Senapati, Sk. (2015). A double phase culture system: An economic and time saving protocol for in vitro propagation of plant. *Saj. Biotechnol.* 1(3), 301.
- Suárez I, Aramendiz H y Pastrana I. (2009). Micropropagación de Caña Flecha (*Gynerium sagittatum* Aubl.), *Revista Facultad Nacional de Agronomía* 62(2):5135-5143.
- Tejeda, L., Tejeda, C., Villabona, O., Tarón, A., Barrios, R., y Tejeda, L. (2007). Aprovechamiento del ñame espinoso (*Dioscorea rotundata*) en la producción de bioplásticos. *Prospectiva*, 5(1), 68-74.

Micropropagación de ñame espino (*dioscorea rotundata*, poir), cultivar botón en sistema de cultivo doble fase

- Thurston, D. (1998). Tropical plant diseases. New York, Estados Unidos de America: The American Phytopathological Society. 2da Eds. 79-82 p.
- Vidoy, I. (2014). Rejuvenecimiento y micropropagación de olivo (*Olea europea* L) (Tesis doctoral). Universidad de Málaga, Málaga, España.
- Yan, H., Yang, L., y Li, Y. (2011). Improved growth and quality of *Dioscorea fordii* Prain et Burk and *Dioscorea alata* plantlets using a temporary immersion system. *Afr. J. Biotechnol*, 10(83), 19444–19448.
- Ziv, M. (1995). In vitro accimatization. En: Aitken, J., Kozai, T. y Smith, M. (Ed.), *Automation an environment control in plant tissue culture* (p. 493-516). Dordrecht, The Netherlands: Kluwer academic Publisher.
- Ziv, M. (2005). Simple bioreactor for mass propagation of plants. *Plant. Cell. Tissue. Organ. Cult*, 81(3), 277-285.

CAPÍTULO 3

EFECTO DEL GENOTIPO, TIPO DE EXPLANTE Y EL PICLORAM EN LA INDUCCIÓN DE LA EMBRIOGÉNESIS SOMÁTICA EN *Dioscorea rotundata*

Heberto Polanco Ortega⁸
Lucía Candelaria Díaz Narváez⁹
Oscar Elías Carmona Wilches¹⁰
Eder Durango Ballesteros¹¹
Javier Darío Beltrán Herrera¹²
Isidro Elías Suárez Padrón¹³

8 Biólogo. Maestría en Biotecnología

9 Biólogo. Maestría en Biotecnología

10 Biólogo. Maestría en Biotecnología.

11 Ingeniero Agrónomo, Maestría en Biotecnología. Doctorado en Biotecnología Agrícola, mención Vegetal. Instructor Investigador en el SENA Programa SENNOVA

12 Biólogo, Maestría en Biología Molecular de Plantas Tropicales y Doctorado en Fitopatología. Profesor de la Universidad de Sucre.

13 Ingeniero Agrónomo, Doctor en Ciencias Hortícolas. Docente Universidad de Córdoba

Introducción

El ñame pertenece al género *Dioscorea* y comprende alrededor de 600 especies cultivadas especialmente en África, siendo Nigeria el mayor productor a nivel mundial (Mandal, 1993; Rodríguez, 2000; Bustamante et al., 2003; Deepika et al., 2013). En Latinoamérica, Colombia es uno de los mayores productores seguido de Brasil, Cuba, Haití, República Dominicana, Costa Rica y Puerto Rico (Reina, 2012). A nivel nacional, las especies más cultivadas son *Dioscorea alata* (ñame criollo) y *Dioscorea rotundata* (ñame espino) principalmente cultivados en los departamentos de Sucre, Córdoba y Bolívar, los cuales aportan el 92% de la producción nacional (Campo, 2011; Reina, 2012; Agronet, 2016). El ñame espino es un cultivo propio de pequeños y medianos productores de la Costa Atlántica de Colombia, y priorizado en el departamento de Sucre por ser una de las principales fuentes de ingreso, empleo rural, área sembrada y alimentación. Así mismo, es un producto de exportación que le ha generado al país ingresos que superan los US\$2.5 millones anuales (Sánchez y Hernández, 2003; Fundación Procaribe, 2012).

A pesar de la importancia económica, social y nutricional del ñame, este presenta múltiples problemas que afectan su producción. Dentro de esta problemática se destacan las pérdidas de 20-30% y hasta del 50% durante la postcosecha y el almacenamiento debido a la susceptibilidad del tubérculo a las pudriciones y al ataque de microorganismos como bacterias, nematodos y hongos como *Colletotrichum gloeosporioides* (Pérea y Buitrago, 2000; Pinzón, Bustamante y Buitrago, 2013; Reina, 2012; Rodríguez, 2015). En otro aspecto, algunos autores como Yan et al. (2011) afirman que la poca disponibilidad de material vegetal se presenta como la principal problemática a solucionar para un manejo eficiente del cultivo. De igual manera, la aplicación de la ingeniería genética se ha visto limitada por la ausencia de protocolos eficientes que permitan la regeneración de plantas y su transformación genética (Manoharan, Nath y Tripahi, 2016).

Frente a esta problemática, surge como alternativa el uso de la embriogénesis somática in vitro, definida como el proceso por el cual las células somáticas se desarrollan en plantas diferenciadas pasando por las etapas típicas embrionarias sin que exista fusión de gametos (Fehér, 2005; Hernández, 2013). Esta técnica se ha establecido en *D. rotundata* mediante el estudio de diferentes factores (Osifo, 1988; Suárez et al., 2011; Rodríguez et al., 2014; Manoharan et al., 2016), sin embargo, aún existen limitaciones en la fase de inducción, en la cual se han reportado porcentajes de inducción de masas proembriogénicas menores al 30%, recalcitrancia y genotipo-dependencia (Suárez et al., 2011; Rodríguez et al., 2014; Manoharan et al., 2016). Por esto, para lograr buenos resultados a través de la embriogénesis somática es necesario tener en cuenta los factores físicos y químicos que activen la ruta embriogénica (Namasivayan, 2007). Con base en lo planteado, con esta investigación se evalúa el efecto del genotipo, el tipo de explante y el efecto de reguladores de crecimiento como el picloram, para el cual hay escasas publicaciones con respecto a su uso como inductor de tejidos embriogénicos en *D. rotundata* (Manoharan et al., 2016).

La embriogénesis somática aplicada al ñame espinoso puede favorecer la propagación masiva de plantas (Hernández, 2013), permite el cultivo de un gran número de unidades reproductivas con raíces y meristemos en el mismo medio, minimizando la necesidad de enraizar como el método convencional (Bathia y Bera, 2015). Adicionalmente, el modo de cultivo se puede escalar usando embriones en medio líquido (Hernández, 2013). Así mismo, se favorece la transferencia de genes en células vegetales embriogénicas lo que constituye una alternativa al fitomejoramiento convencional. Bathia y Bera (2015) afirman que los embriones somáticos son los mejores candidatos para la transformación genética, así como su uso en la producción de semillas sintéticas. Con esta investigación se reportan avances en la etapa inducción de la embriogénesis somática en los cultivares Botón y Alemán de *D. rotundata* lo que a largo plazo puede favorecer la producción de material de siembra, así mismo, se convierte en un punto de partida para futuros programas de fitomejoramiento y producción de semilla sintética, todo esto en función de satisfacer las necesidades de aproximadamente 20 mil familias beneficiarias por este cultivo en el departamento de Sucre y la costa Atlántica.

Metodología

Ubicación Geográfica: Esta investigación se realizó en el Laboratorio de Biotecnología y Cultivo de Tejidos Vegetales de la Universidad de Sucre, Sede Puerta Roja. Ubicado en la ciudad de Sincelejo, cuya posición geográfica en Colombia es 9° 18' de latitud norte y 75 ° 23' de longitud oeste del meridiano de Greenwich (Ortega et al., 2011).

Inducción de masas proembriogénicas, inducción de callos y embriones. Se utilizaron segmentos de pecíolo y hoja con pecíolo de 1,5 cm de longitud aproximadamente, obtenidos a partir de plantas in vitro de 60 días de edad pertenecientes a la especie *D. rotundata* cultivares alemán y Botón, los cuales se depositaron en cajas de Petri, conteniendo medio de cultivo compuesto por Sales MS (Murashige y Skoog, 1962) (4,33 g L⁻¹), sacarosa (30 g L⁻¹), mio-inositol (0,1 g L⁻¹), tiamina HCl (1 mg L⁻¹) y PTC Agar (6 g L⁻¹) (Durango y Oropeza, 2012; Suárez et al., 2011). Este medio fue suplementado con diferentes niveles de picloram (0, 1,2, 3 mg L⁻¹).

Los medios de cultivo con los explantes evaluados se incubaron bajo condiciones de oscuridad, ambos explantes se ubicaron horizontalmente sobre el medio de cultivo. Para las hojas con pecíolo se tuvo en cuenta que la cara abaxial de la lámina foliar estuviera en contacto con el medio. Al final de las 8 semanas se evaluó el porcentaje de masas proembriogénicas (Rodríguez et al., 2014), porcentaje de callos (Shu et al., 2005) y el número de embriones (Manoharan et al., 2016).

Diseño y análisis estadístico.

La investigación se realizó bajo un diseño completamente aleatorizado (DCA), conformado por 16 tratamientos con 12 réplicas por tratamiento. A los datos obtenidos para la variable número de embriones, se aplicó la prueba no paramétrica de Wilcoxon y la prueba de comparación de Kruskal-Wallis. Todos los análisis estadísticos se procesaron en el programa R para Windows, Versión 3.0.4 con los paquetes agricolae y stats (Mendiburu, 2016; R Core Team, 2017).

Inducción de masas proembriogénicas.

Se evidenció la formación de masas proembriogénicas, las presentaron una coloración amarillenta y blanquecina (Figura 1), de aspecto nodular y

friable semejantes a las reportadas por Rodríguez et al. (2015). Se registraron estos tejidos en la cara adaxial de la hoja (Figura 1A) y en la base del pecíolo (Figura 1B) en el cv. Alemán, para el cv. Botón los tejidos embriogénicos se visualizaron en cara adaxial y en la base del pecíolo (Figura 1C y 1D). Se confirmó mediante la técnica de squash y tinción con Lugol la presencia de células embriogénicas presentes en las estructuras observadas, estas células presentaron forma redondeada (Figura 1E), con polaridad establecida, citoplasma denso y depósitos de almidón (Figura 1F), lo que concuerda con lo reportado por Manoharan, Nath y Tripathi (2016). Los depósitos de almidón pueden estar relacionados con el crecimiento y la regulación de la morfogénesis en el desarrollo de los embriones somáticos (Ulisses et al., 2016).

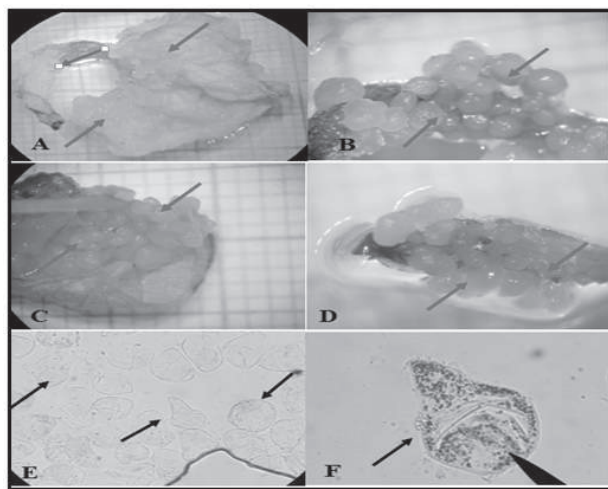


Figura 1. Masas proembriogénicas e histología de células embriogénicas en *D. rotundata*. A: Masas proembriogénicas en hoja con pecíolo cv. Alemán (flechas rojas) a las 8 semanas bajo el efecto de picloram (2 mg L⁻¹), en el mismo explante se observan callos indicados con flecha azul. B: Masas proembriogénicas en el pecíolo cv. Alemán (flechas rojas) a las 8 semanas bajo el efecto de picloram (3 mg L⁻¹). C: Masas proembriogénicas en hoja con pecíolo cv. Botón (flechas rojas) a las 8 semanas bajo el efecto de picloram (3 mg L⁻¹). D: Masas proembriogénicas en pecíolo cv. Botón (flechas rojas) a las 8 semanas bajo el efecto de picloram (3 mg L⁻¹). E y F: Células embriogénicas de *D. rotundata* cv. Alemán bajo el efecto del picloram (2 mg L⁻¹) a las 8 semanas. E: Células embriogénicas sin tinción, indicadas con flechas de color negro. F: Célula embriogénica teñida con Lugol, la flecha negra indica la polaridad de la célula, característica importante en la formación del embrión, así mismo se observan depósitos de almidón.

Durante la inducción de masas proembriogénicas se observó un mayor porcentaje de estas en el cultivar Alemán con respecto al cultivar Botón (Tabla 1), resultado que puede estar asociado al efecto del genotipo en la respuesta embriogénica; al respecto, Deo, Tyagi, Taylor, Harding y Beckert (2010) afirman que entre cultivares de una misma especie es posible encontrar diferencias en la inducción de tejidos embriogénicos, en razón a que algunos genotipos son inducidos con relativa facilidad y otros son recalcitrantes. En ese aspecto, Torres (2007) evaluó la respuesta embriogénica de tres cultivares de *D. rotundata* reportando que los cultivares UC90 y 086 registraron el mayor porcentaje de masas proembriogénicas a diferencia del cultivar 1172, que presentó una respuesta menor. Así mismo, Belarmino y Gonzales (2008) para *D. alata* en la fase de inducción obtuvieron mayor respuesta en la variedad VU-2 en comparación a la variedad Kinampay. Otros autores como Viana y Mantell (1989) reportaron mayor frecuencia de callos inducidos en *D. composita* con respecto a lo obtenido en *D. cayennensis*.

Tabla 1. *Porcentaje de masas proembriogénicas en función del genotipo, tipo de explante y concentraciones de picloram.*

Porcentaje de masas proembriogénicas				
Picloram (mg L ⁻¹)	Alemán		Botón	
	Pecíolo	Hoja con pecíolo	Pecíolo	Hoja con pecíolo
0	0,00	0,00	0,00	0,00
1	58,33	75,00	0,00	25,00
2	50,00	91,67	8,33	50,00
3	75,00	50,00	25,00	16,67

Fuente: *Cálculos del estudio*

Lo planteado indica que en el género *Dioscorea*, el genotipo juega un papel importante en la inducción de tejidos embriogénicos. En la especie *D. rotundata* de acuerdo a los resultados obtenidos es recomendable la utilización de vitroplantas del cultivar alemán para la inducción de masas proembriogénicas. De igual manera, los resultados obtenidos difieren de los reportados para esta especie por Suárez et al (2011) y Rodríguez et al (2014) quienes obtuvieron porcentajes <30% y de 6% respectivamente,

usando hojas con pecíolo y 2,4-D como auxina. Lo que indica que con picloram para esta misma especie los porcentajes de inducción de tejidos embriogénicos pueden superar el 90 %. Esto concuerda con lo planteado por Vacca et al. (2015) quienes reportaron hasta un 95,22 % de tejidos embriogénicos en la especie *Pterogyne nitens*.

En otras especies como *Ipomea batatas* también se ha evidenciado respuestas diferentes entre los cultivares, e inclusive respuesta nula como lo reportado por Triqui et al. (2008) en los cultivares Duclos 11, Guangshu y 953 bajo el efecto del picloram y 2,4-D. La ausencia de respuesta en los genotipos puede estar determinada por la etapa y estado fisiológico de las vitroplantas (Triqui et al., 2008). La menor respuesta en el cultivar Botón puede deberse a una recalcitrancia, que consiste en una nula o baja respuesta morfogénica asociada con células vegetales, tejidos y órganos que no tienen la capacidad de responder a las manipulaciones in vitro (Benson, 2000). La recalcitrancia en este cultivar se presentó para las tres variables evaluadas, resultado que es común para plantas tropicales, las cuales pueden tener compuestos fenólicos que liberados al medio de cultivo pueden inhibir la actividad de algunas proteínas afectando la embriogénesis somática (George, 2008). Sin embargo, la recalcitrancia presente en un cultivar puede resolverse optimizando las condiciones de cultivo o seleccionando mejor el explante (Hernández, 2013).

Con respecto a los tipos de explantes el mayor porcentaje de inducción de masas proembriogénicas se logró en hojas con pecíolo para ambos cultivares (Tabla 1), presentándose el mayor porcentaje de inducción en el cv. Alemán (91,67 %). Estos resultados se obtuvieron empleando una concentración de picloram de 2 mg L⁻¹, la cual resultó ser la más eficiente para la inducción de masas proembriogénicas en ambos cultivares utilizando hojas con pecíolo (Tabla 1). Por su parte, la concentración 3 mg L⁻¹ es la más apropiada para la inducción de estas estructuras en pecíolos para los dos cultivares evaluados, esto indica que los tipos de explantes responden de forma diferente a los niveles de auxina utilizado. Los resultados obtenidos concuerdan con lo reportado en *D. rotundata* por Suárez, Torres y Litz (2011) y Rodríguez et al. (2014) quienes obtuvieron mayor respuesta embriogénica utilizando hojas con pecíolo.

En ese sentido, lo anterior guarda relación a lo obtenido en *Ipomea batatas* por Guevara et al. (2012) quienes lograron mayor respuesta utilizando

hojas con pecíolo, según estos autores, es posible que dichos resultados se deban al área de contacto del explante con el medio. Sin embargo, la respuesta embriogénica evidenciada puede depender de la presencia de células competentes capaces de inducir la embriogénesis somática en respuesta a un estímulo externo (Fehér et al., 2003). La competencia celular está asociada con la desdiferenciación de las células somáticas que les permite responder a las nuevas señales del desarrollo (Fehér, 2008; Yang y Zhang, 2010). Las células competentes se encuentran en un estado transicional en el cual bajo un estímulo exógeno pueden convertirse en embriogénicas (Toonen et al., 1994; Namasivayan, 2007), la competencia celular está relacionada con la utilización de tejidos jóvenes ya que pueden ser más susceptibles de responder a señales externas de inducción y reprogramación celular (Deo et al., 2010), para esta investigación se tuvieron en cuenta vitroplantas que no superaran los 60 días de edad.

Inducción de callos

Los callos obtenidos tenían apariencia cristalina y filamentosa (Figura 2A) en algunos casos asociados con masas proembriogénicas (Figura 1A). Estos callos de acuerdo con la histología realizada estaban conformados por células no embriogénicas, las cuales presentaron forma alargada, desprovistas de núcleo y poco contenido citoplasmático (Figura 2B) características semejantes a las encontradas por Ramírez y García (2012). Los resultados obtenidos coinciden con lo reportado por Manoharan et al. (2016) quienes reportan la presencia de callo no embriogénico semejante a motas de algodón.

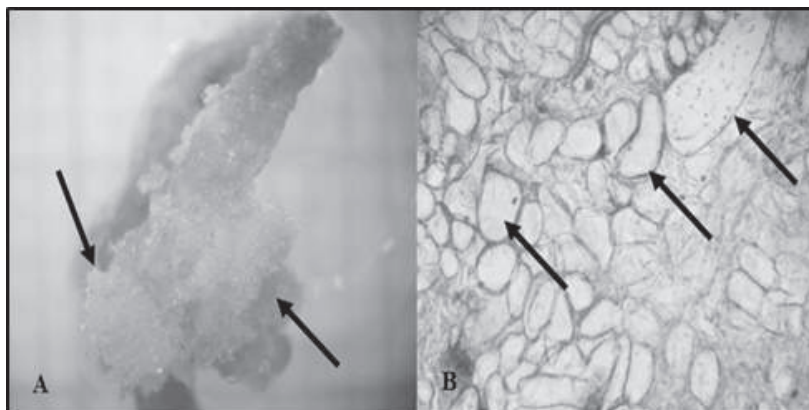


Figura 2. Callos inducidos y células no embriogénicas en *D. rotundata* cv. Alemán mediante el uso de picloram (2 mg L⁻¹) a las 8 semanas. A: Callos obtenidos en hojas con pecíolo (indicadas flechas negras). B: Células no embriogénicas a partir de callos en hojas con pecíolo (indicadas con flechas negras).

La presencia de estas estructuras se evidenció con un mayor valor en el cv. Alemán con respecto al cv. Botón, utilizando hojas con pecíolo (66,67%) bajo el efecto del picloram a 2 mg L⁻¹ (Figura 3) lo que guarda relación con el mayor porcentaje de masas proembriogénicas inducidas. Las células no embriogénicas o carentes de competencia embriogénica, parece ser que sinergizan la formación de tejidos embriogénicos, lo que implica que son necesarias para que se produzca la embriogénesis (Chasan, 1992). La presencia de estos tejidos es un evento común en la embriogénesis somática asociado a los niveles de metilación del ADN durante la etapa de inducción. La metilación del ADN en tejidos no embriogénicos es mayor con respecto a los tejidos embriogénicos como lo describió Noceda et al. (2009) en la embriogénesis somática en *Pinus*, de igual forma a lo reportado en *Eleuterococcus senticosus* en la cual el callo no embriogénico mostró una mayor metilación del ADN (16,99%) con respecto al tejido embriogénico (11,20%) (Chakrabarty et al., 2003), sin embargo, es un tema que requiere múltiples estudios, y para *D. rotundata* aún no hay reportes que expliquen la presencia de tejidos embriogénicos y no embriogénicos desde el punto de vista bioquímico.

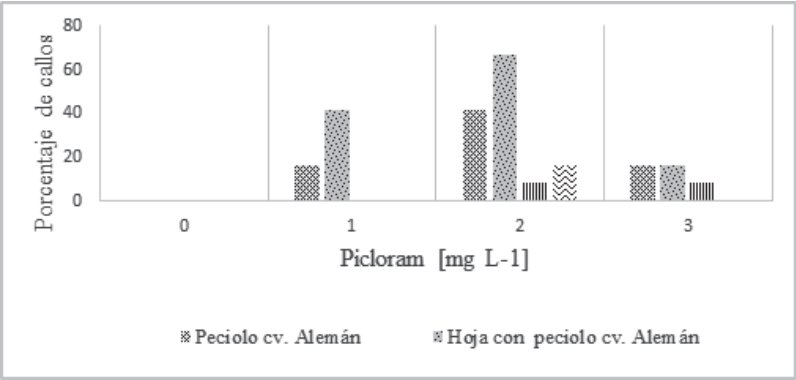


Figura 3. Efecto del picloram, el genotipo y el tipo de explante en la inducción de callos en ñame espino.

Inducción de embriones somáticos.

Se logró la formación de embriones somáticos, los cuales se observaron de color crema opaco, ubicados sobre las masas proembriogénicas (Figura 4), se obtuvo un mayor promedio de embriones somáticos en el cultivar alemán con respecto al cultivar Botón (Tabla 2), entre los cuales se presentaron diferencias significativas, lo cual indica que el genotipo influye en la obtención de embriones somáticos en ñame espino. Así como en las variables anteriores, el genotipo es un factor que controla las respuestas morfogénicas sobre todo en la embriogénesis somática. La influencia genotípica puede tener una base genética, algunas investigaciones al respecto sugieren la ocurrencia de fenómenos epigenéticos como la condensación de la cromatina (Hernández, 2013), se ha revelado que la heterocromatina se caracteriza por la metilación de citosina e histona H3, otros estudios indican la participación de RNAs de interferencia en la condensación de la cromatina. Los patrones de metilación de ADN son hereditarios y se pueden mantener con la mitosis (Rose et al., 2010).

Tabla 2. *Efecto del picloram, el genotipo y el tipo de explantes en la inducción de embriones somáticos de D. rotundata.*

Promedio Número de embriones				
Picloram (mg L ⁻¹)	Alemán		Botón	
	Pecíolo	Hoja con pecíolo	Pecíolo	Hoja con pecíolo
0	0 Ba	0 Ca	0 Ba	0 Ba
1	0,17 Bb	4,25 ABa	0 Bb	1,75 ABa
2	3,00 Ab	7,08 Aa	0,67 ABb	3,50 Aa
3	3,92 Aa	4,17 BCa	2,00 Aa	1,92 ABb

Letras mayúsculas representan diferencias significativas entre los niveles de sacarosa para cada matriz según prueba de Kruskal-Wallis para $p < 0,05$, y letras minúsculas representan diferencias significativas entre matrices para cada nivel de azúcar según prueba de Wilcoxon para $p < 0,05$.

Así mismo, dentro del cultivar alemán se presentaron diferencias significativas entre los tipos de explante utilizados, siendo mayor el promedio de embriones obtenidos en hoja con pecíolo (Tabla 2), demostrando que el tipo de explante utilizado puede influir en la respuesta embriogénica. De igual manera, para el cultivar Botón se presentaron diferencias estadísticas entre los dos tipos de explantes utilizados, siendo mayor el promedio obtenido en hojas con pecíolo bajo el efecto de 2 mg L⁻¹ de picloram. Con base en estos resultados se afirma que la hoja con pecíolo es el explante indicado para lograr la inducción de embriones somáticos en ambos cultivares, logrando una mayor respuesta en el cultivar alemán. Esta respuesta podría estar asociada a una mayor presencia de células competentes a nivel de genotipo/explante. Adicionalmente, los resultados obtenidos pueden depender de otros factores como el nivel endógeno de fitohormonas de los explantes (Gaj, 2004). Se considera que los explantes y cultivos que responden a la transición embriogénica presentan una acumulación de auxinas endógenas (AIA), lo cual se ve influenciado por las condiciones de cultivo determinando el destino embriogénico de una célula en cultivo (Thomas, 2008).

El análisis estadístico aplicado a esta variable demuestra que las concentraciones de picloram evaluadas presentaron diferencias

significativas, obteniéndose mayores resultados con el nivel de 2 mg L⁻¹ en hojas con pecíolo para ambos cultivares (Tabla 2). El ácido 4-amino-3, 5, 6-trichloropicolínico (picloram), es un herbicida auxínico que posee propiedades similares a las auxinas naturales y favorece la inducción de tejidos embriogénicos que de acuerdo con Manoharan et al (2016) en *D. rotundata* puede emplearse en el rango de 0,5 a 16 mg L⁻¹ de concentración. Los resultados obtenidos concuerdan con los reportados por Manoharan et al. (2016) quienes evaluaron el efecto del picloram de forma individual y combinada con sulfato de cobre, caseína hidrolizada y prolina reportando la inducción de callo y de estructuras parecidas a embriones, así como la inducción de embriones somáticos. En contraste con la presente investigación, estos autores emplearon yemas axilares como explante, teniendo en cuenta que la utilización de hojas con pecíolo adherido no fue eficiente para la obtención de estos tejidos. Así mismo, estos resultados difieren de los obtenidos por Belarmino y Gonzáles (2008) en *D. alata* quienes reportaron que el uso de picloram es esencial para la inducción de la embriogénesis somática utilizando una concentración de 1 mg L⁻¹. Autores como Durango y Oropeza (2012) lograron mayor inducción de embriones con niveles de picloram de 4,8 mg L⁻¹ en *D. alata* cultivares Concha de coco y Criollo.

Es importante mencionar que son pocas las investigaciones sobre la inducción de embriones somáticos en *D. rotundata* a nivel departamental y nacional con respecto al uso de picloram, solo algunas investigaciones a nivel internacional como la de Manoharan et al. (2016) han evaluado el efecto de esta auxina en la obtención de tejidos embriogénicos. Por lo tanto el presente trabajo contribuye al conocimiento del efecto del picloram en la embriogénesis somática de *D. rotundata*.

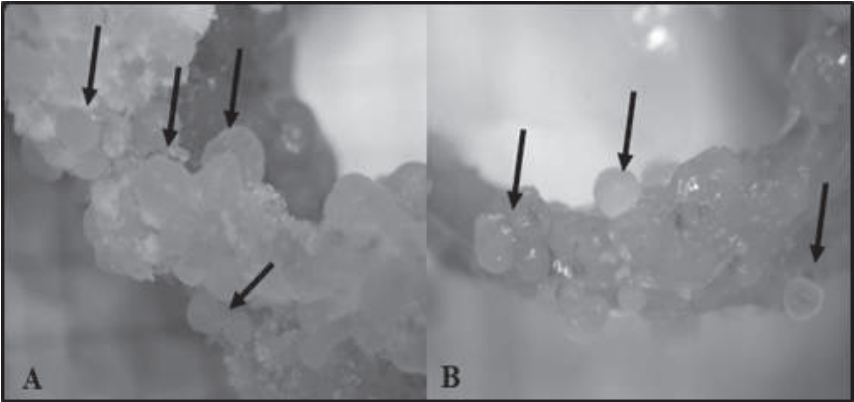


Figura 4. Embriones somáticos de *D. rotundata* inducidos en hojas con pecíolo bajo el efecto de picloram (2 mg L⁻¹) a las 8 semanas (indicados con flechas negras) A. Embriones somáticos de cv. Alemán. B. Embriones somáticos de *D. rotundata* cv. Botón.

Tabla 3. Efecto del picloram, el genotipo y el tipo de explantes en la inducción de embriones somáticos de *D. rotundata*.

Promedio Número de embriones				
Picloram (mg L ⁻¹)	Alemán		Botón	
	Pecíolo	Hoja con pecíolo	Pecíolo	Hoja con pecíolo
0	0 B a	0 C a	0 B a	0 B a
1	0,17 B b	4,25 AB a	0 B b	1,75 AB a
2	3,00 A b	7,08 A a	0,67 AB b	3,50 A a
3	3,92 A a	4,17 BC a	2,00 A a	1,92 AB b

Letras mayúsculas representan diferencias significativas entre los niveles de sacarosa para cada matriz según prueba de Kruskal-Wallis para $p < 0,05$, y letras minúsculas representan diferencias significativas entre matrices para cada nivel de azúcar según prueba de Wilcoxon para $p < 0,05$.

Conclusión

El genotipo, el tipo de explante y el picloram influyen en la inducción de masas proembriogénicas, callos y número de embriones en la especie *D. rotundata*. Por esto, para el establecimiento de la embriogénesis somática

en *D. rotundata* se debe considerar el uso de hojas con pecíolo del cultivar alemán bajo el efecto de una concentración de 2 mg L⁻¹ de picloram. En este sentido, se demostró que es posible inducir masas proembriogénicas en el cultivar alemán con un porcentaje superior al 90%, lo cual constituye una base experimental para futuras investigaciones sobre la optimización de la embriogénesis somática en esta especie.

Referencias Bibliográficas

- Agronet. (2016). Evaluaciones Agropecuarias Municipales. Recuperado de: <http://www.agronet.gov.co/Paginas/estadisticas.aspx>
- Bathia, S., y Bera, T. (2015). Somatic and Organogenesis. En: Bathia, S. (Ed.), *Modern Applications of Plant Biotechnology in Pharmaceutical Sciences* (pp. 209-230). San Diego, U.S.A: Elsevier.
- Belarmino, M. M., y Gonzales, J. R. (2008). Somatic embryogenesis and plant regeneration in purple food yam (*Dioscorea alata* L.). *Annals of Tropical Research*, 30(2), 22-33.
- Benson, E. E. (2000). Special symposium: in vitro plant recalcitrance. In *in vitro Cell. Dev. Biol. Plant* 36_ 141-148.
- Bustamante, S., Guzmán, M., y Buitrago, G. (2003). Caracterización molecular del germoplasma de ñame colombiano utilizando “DNA Amplification Fingerprinting (DAF)” en condiciones radioactivas. *Revista Colombiana de Biotecnología*, 5 (2), 57-63.
- Campo, R. (2011). Manejo Integrado de la Antracnosis (*Colletorichum* spp.) en ñame (*Dioscorea alata*), Mediante el Uso de Alternativas para Reducir el Inoculo Primario, la Dispersión y el Establecimiento del Patógeno. Universidad de Córdoba, Montería, Córdoba
- Chakrabarty, D., Yu, K., y Paek, K. (2003). Detection of DNA methylation changes during somatic embryogenesis of Siberian ginseng (*Eleutherococcus senticosus*). *Plant Science*, 165, 61-68.
- Chasan, R. (1992). Developing somatic embryos. *The Plant Cell*, 4, 367-368.
- Deepika, V., Jayaram, K., y Anima, P. (2013). Isolation and physicochemical characterization of sustained releasing starches from *Dioscorea* of Jharkhand. *International Journal of Biological Macromolecules*, 55 (1), 193-200.

- Deo, P., Tyagi, A., Taylor, M., Harding, R., y Becker, D. (2010). Factors affecting somatic embryogenesis and transformation in modern plant breeding. *The South Pacific Journal of Natural and Applied Sciences*, 28 (1), 27-40.
- Durango, E., y Oropeza. (2012). Embriogénesis somática de ñame (*Dioscorea alata* L): una alternativa para la propagación y conservación. *Memorias, Primer congreso venezolano de ciencia tecnología e innovación*.
- Fehér, A. (2005). Why somatic plant cells start to form embryos? En: A. Mujib y J. Samaj (Ed.), *Somatic embryogenesis* (pp. 85-101). Berlin, Alemania: Springer-Verlag.
- Fehér, A. (2008). The initiation of somatic embryogenesis: What we know and what we don't. *Acta Biologica Szegediensis*, 52 (1), 53-56.
- Fehér, A., Pasternak T, P., y Dudits, D. (2003). Transition of somatic plant cells to an embryogenic state. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 74, 201-228.
- Fundación Procaribe. (2012). Guía Práctica para el manejo orgánico de cultivo de ñame tipo exportación. Recuperado de http://www.swissaid.org.co/sites/default/files/Cartilla%2B%C3%91ame_Julio%2B2012.pdf
- Gaj, M. (2004) Factors influencing somatic embryogenesis induction and plant regeneration with particular reference to *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. *Plant Growth Regulator*, 43(1), 27-47.
- George, E, F. (2008). Plant tissue culture procedure-Background. En: Edwin G. George, Michael A. Hall y Geert-Jan De Klerk (eds.). *Plant Propagation by Tissue Culture 3rd Edition Volume 1. The Background*. Springer, The Netherlands. Pp 1-28.
- Guevara, Y., Suárez, I., y Salgado, J. (2012). Inducción y proliferación in vitro de tejidos celulares de batata (*Ipomea batatas* (L.) Lam.) en medio con 2,4-D. *Temas Agrarios*, 17(2), 9-17.
- Hernández, E. (2013). Embriogénesis somática in vitro y aclimatación de plántulas obtenidas por organogénesis directa en *Heliconia* spp (tesis doctoral). Institución de Enseñanza e Investigación en Ciencias Agrícolas. Montecillo, Texcoco Edo. De México, México.

- Mandal, R.C. (1993). Tropical Root and Tuber Crops. India: Agrobotanical Publishers.
- Manoharan, R., Nath, J., y Tripathi, L. (2016). Plant regeneration from axillary bud derived callus in white yam (*Dioscorea rotundata*). Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 123 (3), 481-497.
- Mendiburu, F. (2016). Agricolae: Statistical Procedures for Agricultural Research. R package version 1.2-4. <http://CRAN.R-project.org/package=agricolae>
- Namasivayam, P. (2007). Acquisition of embryogenic competence during somatic embryogenesis. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 90(1):1-8.
- Noceda, C., Salaj, T., Pérez, M., Viejo, M., Cañal, J., y Salaj, J. (2009). DNA methylation and decrease on free polyamines is associated with the embryogenic capacity of *Pinus nigra* Arn. Cell Culture.Trees, 23, 1285-1293.
- Ortega, R., Beltrán, J., y Marrugo, J. (2011). Acumulación de mercurio (Hg) por caña flecha (*Gynerium sagittatum*) (Aubl) Beauv. in vitro. Revista Colombiana de Biotecnología, 13(1), 33-41.
- Osifo, E. (1988). Somatic embryogenesis in *Dioscorea*. Journal of Plant Physiology, 133(3), 378-380.
- Perea, M., y Buitrago, G. (2000). Aplicación de la biotecnología agrícola al cultivo de ñame. En: Guzmán, M y Buitrago, G. (Ed.), Ñame: producción de semilla por biotecnología (p. 17-32). Bogotá, Colombia: Unibiblos.
- Pinzón, Y., Bustamante, S., y Buitrago, G. (2013). Diagnóstico molecular diferencial *Colletotrichum gloeosporioides* y *Fusarium oxysporum* en ñame (*Dioscorea* sp.). Revista Colombiana de Biotecnología, 17(1), 52-60.
- Ramírez, Maribel., y de García, Eva. (2012). Características marcadoras en suspensiones celulares embriogénicas de banano cien bta-03 (AAAA) y su parental williams (AAA). Bioagro, 24(2), 73-82.
- Reina, Y. (2012). El Cultivo De Ñame En El Caribe Colombiano. Cartagena, Colombia: Banco de la República.
- Rodríguez, D. (2015). Obtención de minitubérculos de ñame (*Dioscorea rotundata* Poir) cv. Blanco de Guinea a partir de plantas in vitro

- y su respuesta en campo (tesis de maestría). Universidad Central Martha Abreu de las Villas, Santa Clara, Cuba.
- Rodríguez, D., López, J., Montano, N., Rayas, A., Basail, M., Beovides, Y., Santos, A., Medero, V., y Gutierrez, Y. (2014). Formación de callos con estructuras embriogénicas en *Dioscorea rotundata* Poir cv. Blanco de Guinea. *Biotecnología Vegetal*, 14(3), 185-188.
- Rodríguez, W. (2000). Botánica, domesticación y fisiología del cultivo de ñame (*Dioscorea alata*). *Agronomía mesoamericana*, 11 (2), 133-152.
- Rose, R., Mantiri, F., Kurdyukov, S., Chen, S., Wang, X., Nolan, K., y Sheahan, M. (2010). Developmental biology of somatic embryogenesis. En: E. Pua y M. Davey (Ed.), *Plant Developmental biology- Biotechnological Perspectives: Vol.2* (pp. 3-26). Berlin, Alemania: Springer-Verlag.
- Sánchez, C., y L. Hernández. (2003). Descripción de Aspectos Productivos de Postcosecha y de Comercialización del Ñame en Córdoba, Sucre y Bolívar. Corpoica.
- Shu, Y., Ying-Cai, Y., y Hong-Hui, L. (2005). Plant regeneration through somatic embryogenesis from callus cultures of *Dioscorea zingiberensis*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 80(2), 157-161.
- Suárez, I., Torres, L., y Litz, R. (2011). Somatic embryogenesis in yam (*Dioscorea rotundata*). *Revista Facultad Nacional de Agronomía, Medellín*, 64(2), 6037-6042.
- Thomas, T.D (2008). The role of activated charcoal in plant tissue culture. *Biotechnology Advances*, 26,618-631.
- Toonen MAJ, Hendriks T, Schmidt Ed DL, Verhoeven HA, Van Kammen A, de Vries SC (1994) Description of
- Torres, L. (2007). Embriogénesis en Ñame (*Dioscorea spp*) a partir de Explantes Foliares (tesis de pregrado). Universidad de Córdoba, Montería, Colombia.
- Triqui, Z., Guedira, A., Chlyah, A., Chlyah, H., Souvannavong, V., Haicour, R., y Sihachakr, D. (2008). Effect of genotype, gelling agent and auxin on the induction of somatic embryogenesis in sweet potato (*Ipomoea batatas* Lam). *Comptes Rendus Biologies*, 331,198-205.
- Ulisses, C., Pereira, J., Silva, S., Arruda E., y Morais, M. (2016). Indução e histologia de embriões somáticos primários e secundários do híbri-

- do Phalaenopsis Classic Spotted Pink (Orchidaceae). *Acta Biológica Colombiana*, 21(3), 571-580.
- Vacca, M., Avilés, Z., Bonomo, M., y Díaz, L. (2015). Efecto del picloram en la inducción de embriogénesis somática en *Pterogyne nitens* Tul. “tipa colorada”. *International Journal of Innovation and Applied Studies*, 11(3), 771-777.
- Viana, A. y Mantell, S. (1989). Callus induction and plant regeneration from excised zygotic embryos of the seed-propagated yams *Dioscorea composite* Hemsl. And *D. cayennensis* Lam. *Plant cellular, Tissue and Organ Culture*, 16, 113-122.
- Yan, H., Yang, L., y Li, Y. (2011). Improved growth and quality of *Dioscorea fordii* Prain et Burk and *Dioscorea alata* plantlets using a temporary immersion system. *African Journal of Biotechnology*, 10(83), 19444 – 19448.
- Yang, J., y Zhang, X. (2010). Regulation of somatic embryogenesis in higher plants. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 29(1), 36-57.

CAPÍTULO 4

EFECTO DE LA SACAROSA Y MATRIZ DE CULTIVO SOBRE EL PROCESO DE MICROTUBERIZACIÓN EN *Dioscorea rotundanta* CULTIVAR BOTÓN

Oscar Elías Carmona Wilches³⁴
Lucía Candelaria Díaz Narváez³⁵
Heberto Polanco Ortega³⁶
Eder Dadner Durango Ballesteros³⁷
Javier Darío Beltrán Herrera³⁸
Isidro Elías Suárez Padrón³⁹

34Biólogo. Maestría en Biotecnología

35Biólogo. Maestría en Biotecnología

36Biólogo. Maestría en Biotecnología

37Ingeniero Agrónomo, Maestría en Biotecnología. Doctorado en Biotecnología Agrícola, mención Vegetal. Instructor Investigador en el SENA Programa SENNOVA.

38Biólogo, Maestría en Biología Molecular de Plantas Tropicales y Doctorado en Fitopatología. Profesor de la Universidad de Sucre.

39Ingeniero Agrónomo, Doctor en Ciencias Hortícolas. Docente Universidad de Córdoba

Introducción

El género *Dioscorea* está representado por al menos 650 especies (Thurston, 1998), de las cuales 11 son utilizadas como fuente de alimento en diferentes países tropicales y subtropicales del mundo, debido a sus tubérculos (ñame), los cuales son estructuras de almacenamiento con un alto contenido de almidón, vitamina C y otros nutrientes (Islam, Keller y Dembele, 2008; Ondo, Kevers y Dommes, 2009).

En Colombia, la especie *Dioscorea rotundata* (ñame espino) es cultivada principalmente por pequeños y medianos agricultores ubicados en los departamentos de Córdoba, Bolívar y Sucre (Reina, 2012). En este último, su cultivo ha sido priorizado como un renglón de importancia económica, debido a la gran cantidad de hectáreas sembradas, a la generación de empleo e ingresos que aporta a la economía local, así como a su alta demanda internacional, a través de su exportación hacia Estados Unidos, Puerto Rico y algunas islas del Caribe (Fundación Procaribe, 2012; Sánchez y Hernández, 1998).

No obstante, el desarrollo extensivo de este cultivo se ha visto limitado, principalmente por dos razones: (i) bajas tasas de multiplicación en campo del material vegetal de plantación (tubérculo), y (ii) alta susceptibilidad del cultivo frente a enfermedades causadas por virus, bacterias, nemátodos y en especial hongos como *Colletotrichum gloeosporioides* (Reina, 2012; Salazar y Beltrán, 2002). Como alternativa, la propagación in vitro de ñame puede solucionar estos problemas, garantizando la calidad fisiológica y fitosanitaria del material de siembra del cultivo. En este sentido, la producción de tubérculos in vitro es considerada una estrategia alternativa y novedosa de propagación clonal, caracterizada por ofrecer un producto de fácil manejo, almacenamiento, transporte y factibilidad para la plantación mecanizada (Cabrera, 2009; Li et al., 2015; Ng, 1988).

No obstante, la microtuberización es un proceso complejo en el que intervienen factores como el genotipo, la concentración de sacarosa, el estado físico del medio de cultivo (sólido o líquido), el fotoperiodo, la concentración de macro elementos como el nitrógeno y los reguladores de crecimiento. (Balogun et al., 2006; Ng, 1988; Ondo, Kevers y Dommès, 2007; Yan, Yang y Li, 2011; Yu, Joyce, Cameron y McCown, 2000). Asimismo, se debe tener en cuenta que al inducir la formación de tubérculos in vitro en un medio libre de reguladores de crecimiento, es posible conocer la capacidad innata de un genotipo para producir microtubérculos, simplificando el proceso y evitando el efecto que ejercen estos mensajeros químicos sobre el periodo de dormancia del tubérculo (Dobránszki, Magyar y Hudák, 2008).

Teniendo en cuenta lo anterior, la presente investigación tuvo como objetivo evaluar el efecto de la sacarosa y el tipo de matriz de cultivo sobre el proceso de tuberización in vitro de la especie *D. rotundata* cultivar Botón en medios de cultivo libres de reguladores de crecimiento y su capacidad de brotación bajo condiciones de casa malla, con el fin de aprovechar las potencialidades de esta técnica para contribuir a garantizar la disponibilidad de material vegetal de siembra de excelente calidad fisiológica y fitosanitaria a los pequeños y medianos productores de ñame del departamento de Sucre a través de campos tan diversos como la conservación de germoplasma, el fitomejoramiento y la micropropagación.

Metodología

Las plantas necesarias para el desarrollo de esta investigación fueron obtenidas a través de subcultivos periódicos cada tres meses de la accesión codificada como 010 (*D. rotundata*, cultivar Botón) perteneciente al Banco de Germoplasma de Ñame de la Universidad de Sucre.

Fase 1: Evaluación del efecto de la sacarosa y el tipo de matriz del medio de cultivo sobre el proceso de tuberización in vitro en *D. rotundata* cultivar Botón

Se estableció una planta de 60 días de edad por frasco (182 cm³) con un volumen de 25 mL de medio de cultivo, el cual estuvo constituido por sales Murashige y Skoog 4,33 g L⁻¹, tiamina 1 mg L⁻¹ y mioinositol 0,1 g L⁻¹ con diferentes concentraciones de sacarosa (0, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70,

80 y 90 g L⁻¹) en matrices de cultivo sólidas (5,5 g L⁻¹ de agar) o líquidas (sin agar).

Los medios de cultivo se ajustaron a un pH de $5,8 \pm 0,1$ y fueron esterilizados por 20 minutos a 15 psi y 121°C, tras lo cual fueron observados durante 7 días, antes de su uso, para descartar cualquier contaminación, tras lo cual el establecimiento de las plantas se realizó bajo condiciones asépticas en cabina de flujo laminar y se incubaron a una temperatura de 25 ± 5 °C, humedad relativa de 65% y una intensidad lumínica de 50 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$.

Evaluación del proceso de microtuberización

Al cabo de 4 y 8 meses de haber iniciado la incubación de las plantas, se tomarón 8 de ellas al azar y fueron retiradas de los frascos para evaluarse las siguientes variables:

- Porcentaje de microtuberización: número de plantas que indujeron microtubérculos dividido por el número de plantas evaluadas y multiplicado por 100% (Balogun et al., 2006).

- Número de microtubérculos: número de microtubérculos producidos por una planta (Ng, 1988).

- Masa fresca promedio de los microtubérculos: Sumatoria de la masa fresca de los microtubérculos producido por una planta dividido por el número total de microtubérculos (Ondo, Kevers y Dommes, 2010).

Diseño y análisis estadístico.

El experimento se montó bajo un diseño completamente aleatorizado, conformado por 40 tratamientos (sacarosa 0, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80 y 90 g L⁻¹; matriz de cultivo sólidas y líquidas, y tiempo de incubación 4 y 8 meses) y 8 réplicas por tratamiento. A las variables número y masa fresca promedio de los microtubérculos se les aplicó las pruebas de normalidad (Shapiro-Wilk) y homogeneidad de varianzas (Bartlett), tras lo cual, se concluyó que las variables no se distribuyen de forma normal. Por lo tanto, se utilizaron las pruebas no paramétricas de Kruskal-Wallis y Mann-Whitney. Por otra parte, la variable porcentaje de tuberización se le aplicó una regresión logística y la prueba de Hosmer-Lemeshow. Todos los análisis estadísticos se procesaron en el programa R para Windows, versión 3.4.3

con los paquetes agricolae, pROC, DescTools y ResourceSelection (Andri, 2018; Mendiburu, 2016; R Core Team, 2017; Subhash, Jonah y Peter, 2017 y Xavier et al., 2011).

Fase 2: Evaluación del efecto de la sacarosa y el tipo de matriz del medio cultivo sobre el porcentaje de brotación de los microtubérculos

Al cabo de 8 meses de incubación bajo condiciones in vitro, los microtubérculos obtenidos en la fase anterior fueron cosechados, lavados con agua destilada y sembrados bajo condiciones de casa malla en bandejas plásticas con un sustrato constituido por tierra negra, bovinaza y arena en proporciones 1:1:1, con riego manual dos veces por semana. El experimento se montó bajo un diseño completamente aleatorizado, conformado por los microtubérculos obtenidos en cada uno de los 20 tratamientos evaluados (sacarosa 0, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80 y 90 g L⁻¹ en matrices de cultivo sólidas y líquidas).

Evaluación del porcentaje de brotación de los microtubérculos.

Una vez transcurridos 5 meses de haber sembrado los microtubérculos se evaluó la siguiente variable:

Porcentaje de brotación: Número de microtubérculos brotados dividido por el número de microtubérculos totales y multiplicado por 100% (Cabrera et al., 2010).

Diseño y análisis estadístico.

El experimento se montó bajo un diseño completamente al azar con 20 tratamientos y 8 réplicas por tratamiento. La variable porcentaje de brotación se le aplicó una regresión logística y la prueba de Hosmer-Lemeshow. Todos los análisis estadísticos se procesaron en el programa R para Windows, versión 3.4.3 con los paquetes pROC, DescTools y ResourceSelection (Andri, 2018; R Core Team, 2017; Subhash et al., 2017 y Xavier et al., 2011).

Resultados y Discusión

Fase 1: Evaluación del efecto de la sacarosa y el tipo de matriz del medio de cultivo sobre el proceso de tuberización in vitro en *D. rotundata* cultivar Botón

Se evidenció que la formación de microtubérculos en *D. rotundata* cultivar Botón fue nula al cabo de 4 meses de incubación, independientemente de la concentración de sacarosa o matriz de medio de cultivo utilizada. Sin embargo, al cabo de 8 meses fue posible observar la formación de microtubérculos, por lo cual el tiempo de incubación de las plantas bajo condiciones in vitro influyó significativamente sobre el proceso de formación de microtubérculos en esta especie.

En contraste, Ng (1988) encontró que el tiempo de formación de los microtubérculos en diferentes variedades de la especie *D. rotundata* fue mucho menor (2 meses o menos) en matrices de cultivo sólidas. Resultados similares fueron reportados por Mbanaso, Chukwu y Opara (2007), quienes encontraron que en esta especie el cultivar Obiaoturugo al ser establecido en matrices de cultivo líquidas tiene la capacidad de producir microtubérculos de hasta 100 mg al cabo de 4 meses. Por consiguiente, es posible que el genotipo de los cultivares de *D. rotundata* influya significativamente sobre el tiempo de formación de los microtubérculos al igual que lo hace con las frecuencias de tuberización (Ng, 1988).

Por otra parte, se observó que todos los microtubérculos se formaron en la base de las yemas axilares ubicadas en la parte superior de las plantas, este comportamiento fue descrito como anormal por Ondo et al. (2007) y lo atribuyó al incremento de sacarosa en el medio de cultivo, la cual también es responsable de la formación de callo abundante alrededor de los nudos de la planta.

En este sentido, los resultados arrojados por esta investigación mostraron que, al establecer plantas de *D. rotundata* en matrices de cultivo líquidas en presencia de sacarosa, algunas de las yemas axilares en contacto con el medio de cultivo se hincharon (15 días o menos) y al cabo de 4 meses se caracterizaron por estar unidas a callo y poseer muchas raíces, tal y como lo indicó Ng (1988).

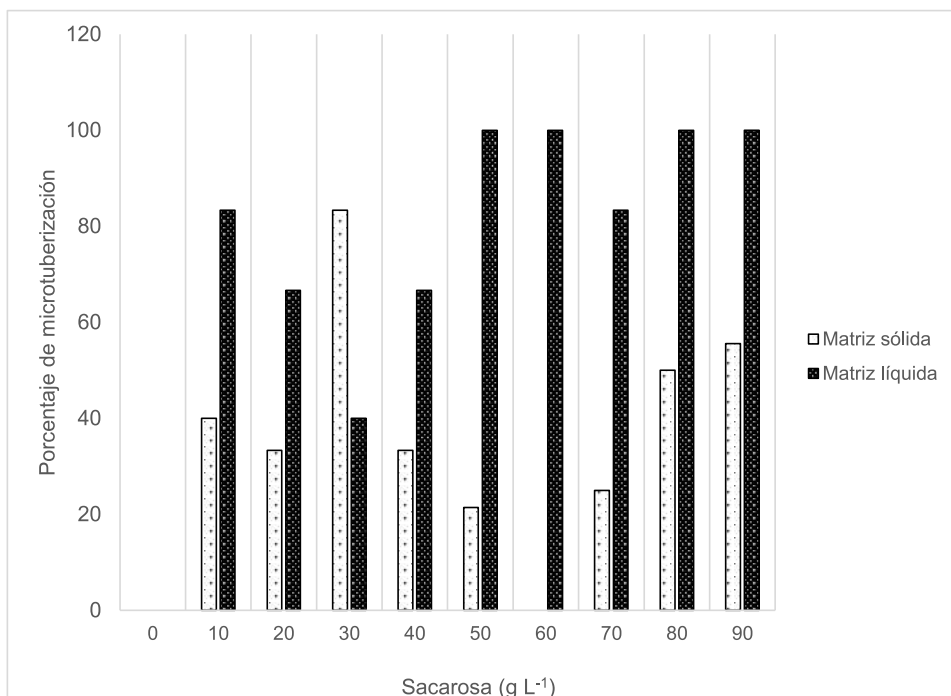


Figura 2. Efecto de la sacarosa y el tipo de matriz de cultivo sobre la formación de microtubérculos en *D. rotundata* cultivar Botón.

Adicionalmente, en esta investigación se encontró que en *D. rotundata* cultivar Botón la formación de microtubérculos puede ocurrir en medios de cultivo líquidos y sólidos suplementados con sacarosa en concentraciones que varían de 10 a 90 g L⁻¹ sin necesidad de adicionar reguladores de crecimiento al mismo (figura1), lo cual concuerda con los resultados obtenidos por Mbanaso et al. (2007) y Ondo et al., (2007). Además, la regresión logística realizada demostró que la probabilidad de tuberización de las plantas de *D. rotundata* cultivar Botón están asociadas al tipo de matriz de cultivo utilizada. En este sentido, al emplear matrices de cultivo líquidas la probabilidad de tuberización de las plantas es significativamente superior a los resultados observados en matrices de cultivo sólidas.

Asimismo, fue posible determinar que la concentración de sacarosa está asociada a la probabilidad de formar microtubérculos en matrices de cultivo líquidas en *D. rotundata* cultivar Botón, es decir, que a medida que aumenta la concentración de sacarosa bajo estas condiciones la probabilidad de formar microtubérculos en esta especie se incrementa. En consecuencia, el porcentaje de tuberización en *D. rotundata* cultivar Botón fue superior

en matrices de cultivo líquida, especialmente al suplementar el medio de cultivo con 50, 60, 80 o 90 g L⁻¹ de sacarosa, con lo cual fue posible inducir el máximo porcentaje de tuberización in vitro (figura 1).

Número y masa fresca promedio de los microtubérculos producidos por planta

Al cabo de 8 meses de incubación bajo condiciones in vitro de *D. rotundata* cultivar Botón se encontró que la concentración de sacarosa influyó significativamente sobre el número y masa fresca promedio de microtubérculos por planta, independientemente del tipo de matriz de cultivo utilizada (Tabla 1). Confirmando así, lo expresado por Yu et al. (2000), quienes consideran a la sacarosa como el factor más importante en el proceso de microtuberización.

No obstante, pese a la importancia de este factor, su mecanismo de acción para inducir la formación de microtubérculos no se conoce en detalle (Ondo et al., 2007), sin embargo, Jo, Tewari, Hahn y Paek (2009) sugieren que la sacarosa puede constituir un regulador osmótico esencial durante el proceso, así como una fuente de energía, la cual en concentraciones adecuadas podría actuar como una señal para la formación de los microtubérculos.

Por otro lado, se observó que el número y masa fresca promedio de los microtubérculos de esta especie en matrices de cultivo líquida presentó valores estadísticamente iguales o superiores a los presentados en matrices sólidas para cada una de las concentraciones de sacarosa utilizadas (Tabla 1). En este sentido, es posible que estos resultados se deban a que las matrices de cultivo líquidas poseen características que favorecen el proceso de microtuberización tales como: I) incrementar la disponibilidad de agua y nutrientes disueltos en el medio de cultivo (Singha 1982, citado por Avila, Pereyre y Argüello, 1996; Debergh, 1983), II) reducir los gradientes de nutrientes y hormonas endógenas (Gawel y Robacker 1990), III) eliminar la polaridad y IV) disminuir el efecto de las toxinas sobre el tejido vegetal (Ascough y Fennell, 2004).

En consecuencia, el mayor número de microtubérculos producidos por planta en matrices de cultivo líquidas se obtuvo al utilizar 80 g L⁻¹ de sacarosa, este valor no presentó diferencias estadísticamente significativas con los obtenidos al emplear 70, 60, 50 o 20 g L⁻¹ de la misma, pero si con el resto de niveles azúcar, asimismo se encontró que el número de microtubérculos producidos bajo estas condiciones por las plantas fue

significativamente superior a los obtenidos en matrices de cultivo sólidas (Tabla 1).

Tabla 1. Efecto de la sacarosa en matrices de cultivo sólidas y líquidas sobre el número y masa fresca de los microtubérculos en D. rotundata cultivar Botón.

Sacarosa (mg L ⁻¹)	Número de microtubérculos promedio por planta		Masa fresca promedio de los microtubérculos por planta en mg	
	Matriz Sólida	Matriz Líquida	Matriz Sólida	Matriz Líquida
0	0,00 DE a	0 E a	0,00 C a	0,00 E a
10	0,4 BC b	1,17 CD a	17,85 B b	64,13 CD a
20	0,33 BCDE b	2,33 ABC a	7,77 BC b	66,60 CD a
30	0,83 A a	0,80 DE a	29,68 A a	18,16 DE a
40	0,42 BCD b	1,50 CD a	27,86 B b	155,60 BC a
50	0,21 CDE b	2,3 ABC a	18,82 BC b	258,31 A a
60	0,00 E b	3,33 AB a	0,00 C b	117,43 BC a
70	0,25 BCDE b	3,67 AB a	6,81 BC b	130,07 BC a
80	0,9 ABC b	3,67 A a	16,38 AB b	104,27 BC a
90	1,4 AB a	2,17 BCD a	4,91 B b	245,50 AB a

Letras mayúsculas representan diferencias significativas entre los niveles de sacarosa para cada matriz según prueba de Kruskal-Wallis para $p < 0,05$, y letras minúsculas representan diferencias significativas entre matrices para cada nivel de azúcar según prueba de Mann-Whitney para $p < 0,05$.

Por otro lado, la mayor masa fresca promedio (258,31 mg) de microtubérculos producidos por planta en matrices de cultivo líquidas se obtuvo al utilizar 50 g L⁻¹ de sacarosa, este valor no presentó diferencias estadísticamente significativas con el obtenido al emplear 90 g L⁻¹ de sacarosa (figura 2), pero si con el resto de niveles de azúcar, de igual forma también se encontró que la masa fresca de los microtubérculos producidos bajo estas condiciones por las plantas fue significativamente superior a los obtenidos en matrices de cultivo sólidas (Tabla 1).



Figura 3. Microtubérculos producidos por plantas de *D. rotundata* cultivar Botón en matrices de cultivo líquidas suplementadas con 90 g L^{-1} de sacarosa.

Fase 2: Evaluación del efecto de la sacarosa y el tipo de matriz del medio cultivo sobre el porcentaje de brotación de los microtubérculos

Porcentaje de brotación de los microtubérculos bajo condiciones de casa malla.

En este experimento se observó que el porcentaje de brotación de los microtubérculos de *D. rotundata* cultivar Botón obtenidos en matrices de cultivo sólidas fue cero, independientemente de la concentración de sacarosa utilizada (figura 3). Sin embargo, los microtubérculos obtenidos en matrices de cultivo líquidas suplementadas con 40, 50, 60, 70, 80 o 90 g L^{-1} de sacarosa brotaron y dieron lugar a plantas bajo condiciones de casa malla (figura 3).

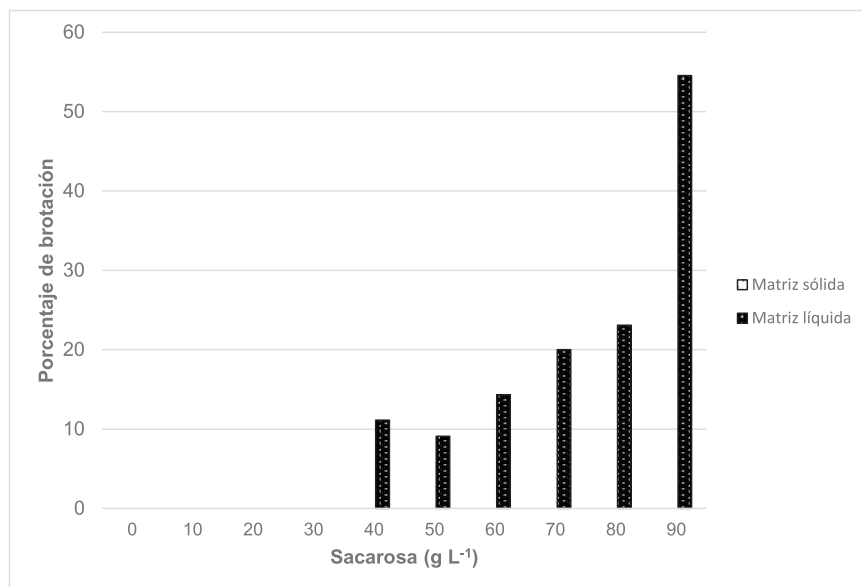


Figura 3. Efecto de la sacarosa y el tipo de matriz de cultivo sobre el porcentaje de brotación de los microtubérculos en *D. rotundata* cultivar Botón.

Adicionalmente, la regresión logística realizada mostró que la probabilidad de brotación de un microtubérculo tiende a ser mayor si la planta que lo produjo se incubó en matrices de cultivo líquidas con respecto a los resultados obtenidos en matrices sólidas. Asimismo, se encontró que la concentración de sacarosa empleada en el medio de cultivo influyó significativamente sobre la probabilidad que tiene un microtubérculo de brotar, en consecuencia, a mayor concentración de sacarosa, mayor es la probabilidad de brotación.

Estos resultados concuerdan con lo reportado por Coleman, Donnelly y Coleman (2001), quienes afirman que el porcentaje de brotación de los microtubérculos se ve influenciado por las condiciones bajo las cuales fueron producidos, especialmente por la concentración de sacarosa empleada en el medio de cultivo, ya que es posible que los microtubérculos producidos en medios de cultivo con altas concentraciones de sacarosa podrían acumular mayor cantidad de reservas como el almidón, el cual podría ser movilizado durante el proceso de brotación de los microtubérculos para sustentar el posterior crecimiento y desarrollo de sus brotes, explicando así de forma parcial el mayor porcentaje de brotación observado en tubérculos producidos in vitro en matrices de cultivo líquidas con concentraciones de sacarosa entre 40 y 90 g L⁻¹ (Ondo et al., 2009; Naik y Karihaloo, 2007).

Asimismo, se debe tener en cuenta que la cantidad de reservas de un microtubérculo (almidón) está muy relacionada con su masa fresca y por tanto con la capacidad de brotación del mismo, frente a lo cual Cabrera et al. (2010) han reportado que la masa fresca de un microtubérculo influye significativamente sobre su porcentaje brotación, de forma tal que microtubérculos con una masa igual o superior a 3 g tienen un porcentaje de brotación significativamente superior a los obtenidos por microtubérculos con una masa fresca entre 0,5 y 0,9 g.

Por consiguiente, es posible que la falta de brotación de los microtubérculos producidos en matrices de cultivo sólida (figura 3) se deba a la baja masa fresca de los microtubérculos (menor a 0,1 g), los cuales no disponen de la cantidad suficiente de sustancias de reserva para dar lugar al proceso de brotación. En contraste, al aprovechar las ventajas de incubar las plantas en matrices de cultivo líquidas, tal como lo es mejorar la disponibilidad de agua y nutrientes (Singha 1982, citado por Ávila et al., 1996; Debergh, 1983), fue posible obtener microtubérculos con una mayor cantidad de reservas que les permitieron sustentar el proceso de brotación una vez sembrados bajo condiciones de casa malla, especialmente cuando la incubación de la plantas bajo condiciones in vitro se realizó en medios de cultivo suplementados con 90 g L⁻¹ de sacarosa (figura 4).

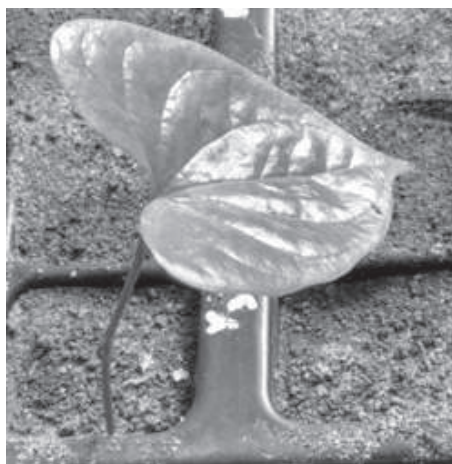


Figura 4. Planta de *D. rotundata* cultivar Botón obtenida bajo condiciones de casa malla a partir de microtubérculos producidos en matrices de cultivo líquidas suplementadas con 90 g L⁻¹ de sacarosa.

Conclusiones

La especie *D. rotundata* cultivar Botón tiene la capacidad de formar tubérculos bajo condiciones in vitro en medios de cultivo libres de reguladores de crecimiento. Durante este proceso, la concentración de sacarosa y el tipo de matriz de cultivo influyen sobre el porcentaje de formación, número, masa fresca y porcentaje de brotación de los microtubérculos, por lo cual se recomienda incubar plantas de 60 días de edad en matrices de cultivo líquidas suplementadas con 90 g L⁻¹ de sacarosa durante 8 meses para favorecer la formación de microtubérculos con la capacidad de brotar y formar plantas bajo condiciones de casa malla.

Referencias Bibliográficas

- Andri, S. (2018). DescTools: Tools for descriptive statistics. R package version 0.99.24.
- Ascough, G., y Fennell, C. (2004). The regulation of plant growth and development in liquid culture. *S. Afr. J. Bot.*, 70(2), 181-190.
- Avila, A., Pereyre, S. y Argüello, J. (1996). Potato micropropagation: Growth of cultivars in solid and liquid media. *Am. J. Potato Res.*, 39(1), 253-258.
- Balogun, M., Fawole, L., SYC, N., NQ, N., Shiwachi, H., y Kikuno, H. (2006). Interactions among cultural factors in microtuberization of white yam *Dioscorea rotundata*). *Tropical Science*, 46(1): 55-59.
- Cabrera, M. (2009). Empleo de métodos biotecnológicos para la propagación de ñame. *Biotecnología Vegetal*, 9(4), 195-209.
- Cabrera, M., Gómez, R., Rayas, A., De Feria, M., López, J., Medero, V., Basail, M., Rodríguez, G., y Santos, A. (2010). Evaluación en campo de plantas de ñame (*Dioscorea alata* L.) obtenidas de los microtubérculos formados en Sistema de Inmersión Temporal. *Revista Colombiana de Biotecnología*, 12(1), 47-56.
- Coleman, W., Donnelly, D., y Coleman, S. (2001). Potato Microtubers as Research Tools: A Review. *American Journal of Potato Research*, 78(1), 47-55.
- Debergh, P. (1983). Effects of agar brand and concentration on the tissue culture medium. *Physiol. Plant*, 59(1), 270-576.

- Dobránszki, J., Magyar, K., y Hudák, I. (2008). In vitro tuberization in hormone-free systems on solidified medium and dormancy of potato microtubers. *Fruit, Vegetable and Cereal Science and Biotechnology*. 2(1), 82-94.
- Fundación procaribe. (2012). Guía práctica para el manejo orgánico de cultivo de ñame tipo exportación. Recuperado de https://issuu.com/swissaid-ko/docs/cartilla_ame_julio_2012
- Gawel, N. y Robacker, C. (1990). Somatic embryogenesis in two *Gossypium hirsutum* genotypes on semisolid versus liquid proliferation media. *Plant. Cell. Tissue. Org. Cult*, 23(1), 201-204.
- Islam, M., Keller, E., y Dembele, D. (2008). Effects of Growth Regulators on In vitro Propagation and Tuberization of Four *Dioscorea* Species. *Plant Tissue Culture And Biotechnology*, 18(1), 25-35.
- Jo, E., Tewari, R., Hahn, E., y Paek, K. (2009) In vitro sucrose concentration affects growth and acclimatization of *Alocasia amazonica* plantlets. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 96(1), 307-315.
- Li, M., Li, J., Wang, Y., Liu, W., Guo, X., Li, S., Han, L., Song, Z., Zhao, X., y Yang, Q. (2015). A simple method for microtuber production in *Dioscorea opposita* using single nodal segments. *Pak. Journal of Botany*, 47(2), 665-668.
- Mbanaso, E., Chukwu, L., y Opara, M. (2007). In vitro basal and nodal microtuberization in yam shoot cultures (*Dioscorea rotundata* poir, cv. Obiaoturugo) under nutritional stress conditions. *African Journal of Biotechnology*, 6(21), 2444-2446.
- Mendiburu, F. (2016). agricolae: Statistical Procedures for Agricultural Research. R package version 1.2-4. <http://CRAN.R-project.org/package=agricolae>
- Naik, P., y Karihaloo, J. (2007). Micropropagation for Production of Quality Potato Seed in Asia-Pacific. New Delhi: Asia-Pacific Consortium on Agricultural Biotechnology. 54 p.
- Ng, S. (1988). In vitro tuberization in white yam (*Dioscorea rotundata* Poir.). *Plant cell, Tissue and Organ Culture*, 14(1), 121-128.
- Ondo, P., Kevers, C., y Dommes, J. (2007). Axillary proliferation and tuberisation of *Dioscorea cayenensis*-*D. rotundata* complex. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 91(1), 107-114.

- Ondo, P., Kevers, C., y Dommes, J. (2009). Effects of reducing sugar concentration on in vitro tuber formation and sprouting in yam (*Dioscorea cayenensis*-*D. rotundata* complex). *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 99(1), 55-59.
- Ondo, P., Kevers, C., y Dommes, J. (2010). Tuber formation and development of *Dioscorea cayenensis*-*Dioscorea rotundata* complex in vitro effect of polyamines. *In Vitro Cellular & Developmental Biology – Plant*, 46(1), 81-88.
- R core team. (2017). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria.
- Reina, Y. (2012). Documentos sobre economía regional: El cultivo de ñame en el Caribe colombiano. Banco de la República, Cartagena.
- Salazar, R., y Beltrán, J. (2002). Microtuberización en Ñame (*Dioscorea alata* L.) var. “Pico de Botella”. *Revista Colombiana de Biotecnología*, 4(2), 27-32.
- Sánchez, C., y Hernández, L. (1998). Descripción de aspectos productivos de postcosecha y de comercialización del ñame en Córdoba, Sucre y Bolívar.
- Subhash, R., Jonah, L., y Peter, Solymos. (2017). ResourceSelection: Resource Selection (Probability) Functions for Use-Availability Data. R package version 0.3-2.
- Thurston, D. (1998). *Tropical plant diseases*. New York, Estados Unidos de America: The American Phytopathological Society.
- Xavier, R., Natacha, T., Alexandre, H., Natalia, T., Frédérique, L., Jean-Charles, S. y Markus, Müller. (2011). pROC: an open-source package for R and S+ to analyze and compare ROC curves. *BMC Bioinformatics*, 12, p. 77.
- Yan, H., Yang, L., y Li, Y. (2011). Axillary shoot proliferation and tuberization of *Dioscorea fordii* Prain et Burk. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 104(1), 193-198.
- Yu, W., Joyce, P., Cameron, D., y McCown, B. (2000). Sucrose utilization during potato microtuber growth in bioreactors. *Plant Cell Reports*, 19(1), 407-413.

CAPÍTULO 5

TOLERANCIA AL ESTRÉS SALINO EN PLANTAS DE ÑAME ESPINO (*DIOSCOREA ROTUNDATA. POIR*)

María Paulina Torres Pérez¹⁴
Eder Durango Ballesteros¹⁵

¹⁴Biólogo. Magister en ciencias Ambientales. Joven Investigadora CECAR

¹⁵Ingeniero Agrónomo, Maestría en Biotecnología. Doctorado en Biotecnología Agrícola, mención Vegetal. Instructor Investigador en el SENA Programa SENNOVA

Introducción

El ñame se ha convertido en uno de los principales alimentos para un grupo innumerable de personas que habitan en regiones tropicales y subtropicales, África, América Central, Sur América, partes de Asia, Caribe e Islas del Pacífico, debido a su alto contenido de carbohidratos (Tous, 2010). Lo que ha generado una alta demanda en su comercialización y por ende en la economía a nivel mundial (Amusa, et al; 2004).

Como todo cultivo, el ñame se puede ver afectado por enfermedades que generen la disminución del rendimiento y la calidad del producto final (Reina, 2012). La producción de ñame en Colombia se ha visto afectada principalmente por enfermedades fúngicas como, la antracnosis, ocasionada *Colletotrichum gloeosporioides*, la cual ha ocasionado en el país una de las afectaciones de mayor grado causando una reducción en el área sembrada de 25.000 hectáreas en el 1989 a 1.000 hectáreas 1990 (Reina, 2012) donde la región Caribe fue la que sufrió el mayor impacto por ser el área de mayor producción de ñame (Cerón, et al; 2006). Como una posible solución a las necesidades de establecer el cultivo de ñame la Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria (Corpoica) comenzó en el año de 1986 a establecer la búsqueda de genotipos más resistentes de ñame criollo por ser el más susceptible a la enfermedad antracnosis (Reina, 2012). Diferentes entidades Corpoica, ICA, universidades de Sucre y Córdoba, se han dedicado al mejoramiento del cultivo estableciendo cultivos in vitro de ñame con el fin de mejorar su resistencia.

La fase de aclimatación en vivero de las plántulas de ñame, constituyen uno de los pasos más importantes que garantizan la supervivencia del cultivo en campo (Garrido, et al; 2010). Una vez estas plántulas pasan a campo los parámetros fisicoquímicos, químicos, físicos y biológicos del suelo no estarán controlados puesto que son propios de cada tipo de sustrato, por lo que las plántulas de ñame presentan los mayores índices de mortalidad (Díaz, et al; 2010). A partir de esto, surge la necesidad de evaluar

las condiciones del suelo donde serán trasladados los cultivos de plántulas generadas in vitro o los establecidos mediante siembra convencional, con la finalidad de establecer parámetros que nos ayuden a garantizar la supervivencia de la mayor parte de las plantas cultivadas.

Uno de los principales problemas presentes en los diferentes cultivos, se encuentran relacionados con la salinidad de los suelos cultivables. Este fenómeno afecta a la humanidad desde el inicio de la Agricultura, y existen registros históricos de migraciones provocadas por la salinización del suelo (africano, et al; 2015). Aproximadamente, el 10% de los suelos a nivel mundial se encuentran afectados por parámetros de salinidad y se calcula que entre el 25 y 50 % de las zonas de regadío están salinizadas (Rhoades, et al; 1992). En Colombia, alrededor de 600.000 hectáreas se encuentran afectadas por sales, que corresponden al 0,52 % de la superficie total del país (Casierra-Posada, et al., 2000).

La salinidad de los suelos se puede generar de forma natural, es decir, a partir de la acumulación de sales por largos periodos de tiempo en zonas áridas y semiáridas procedente de la erosión de las rocas parentales que liberan sales solubles de varios tipos, principalmente cloruros de sodio, calcio y magnesio, y en menor grado, sulfatos y carbonatos (Petrone S., 2013), siendo el cloruro de sodio (NaCl) la sal que se libera de manera más abundante y es la más soluble (Flowers, 2004), otra de las causas más comunes es la deposición de sales orgánicas acarreada por el viento y la lluvia. La lluvia que contiene 10 mg/kg de NaCl y deposita 10 kg/ha de sal por cada 100 mm de lluvia al año (Munns, et al; 2008).

Dentro de los principales departamentos de Colombia dedicados al cultivo de ñame para el sustento y comercialización se encuentran Córdoba, Sucre, Bolívar, Atlántico y Magdalena (Ballesteros et al; 2000). El departamento de Sucre, cuenta con varios municipios dedicados al cultivo de ñame como son Corozal, Sincelejo, Toluviéjo, Sampués y los Palmitos (Lavalett Oñate, 2009).

Los municipios del departamento de Sucre, se encuentran divididos en cinco subregiones fisiográficas: Golfo de Morrosquillo, Montes de María, Sabanas, San Jorge y La Mojana, el municipio de Toluviéjo mencionado anteriormente como uno de los dedicados al cultivo del ñame; hace parte de la subregión golfo de Morrosquillo, la cual; se ubica al norte del

departamento, bordeada por las playas del golfo de Morrosquillo, gracias a su ubicación estas zonas costeras presenta limitaciones por fertilidad, acidez, salinidad o en algunos casos encharcamiento (Aguilera, 2005). Por lo tanto, es de suponerse el poco establecimiento de las actividades agrícolas gracias a la salinidad de los suelos, puesto que, los Solonchaks y Solonetz, se encuentran en zonas climáticas áridas y semiáridas y regiones costeras en todos los climas (IUSS, 2007).

Con el desarrollo de esta investigación, se busca establecer límites tolerables de salinidad en el suelo para implantar el cultivo de ñame mediante la utilización de semillas asexual y plántulas generadas in vitro, con el fin de garantizar la supervivencia en campo del cultivo y de esta forma descartar problemas de germinación de las semillas por parámetros de salinidad. De igual forma, busca reducir las pérdidas económicas de los agricultores, fomentar como actividad económica la agricultura y promover en los agricultores los estudios de análisis del suelo, por el hecho de que mediante el conocimiento las características de este se pueden evitar futuros problemas que afecten negativamente la supervivencia y productividad de los cultivos establecidos en la región Sucreña.

En Colombia, el cultivo de ñame representa una de las principales fuentes de alimentación de la costa atlántica y de ingresos en diferentes zonas del país para los pequeños y grandes agricultores en las principales zonas de producción dentro de las que podemos mencionar: zonas costeras del departamento de Córdoba, municipios del Cesar y la Guajira, la subregión de los Montes de María en los departamentos de Bolívar y Sucre donde también es comercializado (Ballesteros, et al; 2000). Datos proporcionados por la FAO, indican que Colombia con 361.034 toneladas se encuentra entre los países americanos que en el año 2012 hicieron parte de la lista de los veinte países con mayor producción a nivel mundial del cultivo de ñame; donde reportan un área cosechada de 30.929 ha y un rendimiento de 11,7 t/ha (Pinzón, 2014).

Los departamentos de Córdoba, Bolívar y Sucre, que hacen parte de la región caribe colombiana, son los que aportan más del 90% de la producción de ñame para este país; los principales municipios dedicados a la siembra del cultivo de ñame son: Chalan, Coloso, Toluviejo, Ovejas, Carmen de Bolívar, Sampués, Morroa, San Antero, Coveñas, Lórica,

Moñitos, San Pelayo, Cereté, Sincelejo, San Jacinto, San Juan Nepomuceno, San Antonio y Palmito (Pinzón, 2014).

En el departamento de Sucre las especies más cultivadas son el ñame “Espino” (*Dioscórrea rotundata*) y el ñame “Criollo” (*Dioscórrea alata*) con alrededor de un 75% de la cantidad total cultivada (Reina, 2012). Las condiciones climáticas en este departamento favorecen el desarrollo de la enfermedad antracnosis lo que genera la baja productividad del cultivo y afecta la calidad del tubérculo de ñame (Negrete, et al; 1997). Por su parte, en la costa Atlántica la producción convencional de ñame se realiza de manera muy rudimentaria lo que incrementa costos, reduce la producción y contribuye a la presencia de problemas fitosanitarios (Garrido, et al; 2010). Con el fin de brindarle solución a los problemas fitosanitarios se ha empleado el uso de técnicas biotecnológicas como cultivos de tejidos vegetales a través de la propagación in vitro que permite la producción masiva de plantas libres de patógenos, a bajo costo, en espacio reducido, en menor tiempo, bajo condiciones controladas (Calva, et al; 2005). Uno de los inconvenientes que se presentan con respecto a las plantas generadas in vitro es el proceso de aclimatación debido a que las condiciones de invernadero son diferentes a las condiciones de crecimiento in vitro (Primitiva et al., 2010). Uno de los problemas que se pueden presentar al momento de trasladar este tipo de plantas a campo es enfrentarse a suelos altamente salinos lo que muy posiblemente puede generar estrés en la planta y conducir a la muerte de la misma ya que estas se manejan en condiciones controladas.

El departamento de Sucre, cuenta con varios municipios dedicados al cultivo de ñame, siendo uno de esto Toluvié (Lavalett, 2009) que hace parte de la subregion Golfo de Morrosquillo y por ser una zona costera, supone suelos con alto grado de salinidad.

Dentro de los principales factores abióticos que afectan la productividad de los cultivos alrededor del mundo, es la salinidad de los suelos (Petrone, 2013). Un suelo es salino cuando presenta enriquecimiento con cloruros y sulfatos de sodio y magnesio (Garsaball, et al; 2007). Un suelo salino, presenta una alta concentración de sales solubles y se caracterizan cuando la conductividad eléctrica (ECe) es 4 dS/m o más, que es igual a tener aproximadamente 40 mMNaCl, generando una presión osmótica de aproximadamente 0.2 MPa (Tester, et al; 2003). Una de las causas que

ocasionan la salinidad de los suelos, está ligada a la deposición de sales oceánicas conducidas en el viento y la lluvia (petrone, 2013). El contenido de NaCl en el agua lluvia es de 6-50 mg/kg esta concentración presenta una disminución con la distancia de la costa (Petrone, 2013). El agua lluvia que contiene 10 mg/kg de NaCl deposita 10 kg/ha de sal por cada 100 mm de lluvia al año (Munns, et al; 2008).

La alta concentración de sales en el suelo, propone ser un riesgo innegable para la agricultura, un estudio realizado por Garsaball y colaboradores en el 2007, encontró que el incremento en los niveles de salinidad disminuye la germinación de las semillas de maíz, ciertamente las plantas que son capaces de crecer bajo condiciones de alta salinidad, son las halófitas las cuales crecen en concentraciones de NaCl mayores a 400 mM (Flowers, 2004), sin embargo, Posada y Colaboradores en el 2000 indicaron que las plantas de Lulo (*Solanum quitoense* L.), presentan una tolerancia moderada a la salinidad NaCl, al igual que Petrone, 2013 en su estudio Variación funcional relacionada con la tolerancia al estrés salino de *Gossypium hirsutum* en México; indica que los cultivares de algodón se clasifican como cultivos medianamente tolerantes al estrés salino, y su crecimiento disminuye a los 7.7 dS/m.

Uno de los factores abióticos de estrés para el desarrollo de plantas es la salinidad, representando graves problemas para la agricultura. Altas concentraciones de sal en los suelos, disminuyen las cosechas en una gran variedad de plantas, por tanto, un carácter de importancia en la mejora de plantas es la selección a tolerancia a salinidad. Mediante técnicas de selección in vitro se puede conseguir mejorar considerablemente la tolerancia a la salinidad de plantas con importancia agrícolas. (Gutiérrez et al, 2003).

Bajo condiciones de campo, las altas concentraciones de sales y la sequía constituyen las mayores causas de estrés osmótico para las plantas. Las membranas citoplasmáticas en las células vegetales presentan un potencial eléctrico de -140 mV, el cual favorece el transporte pasivo de Na⁺ hacia el interior de la célula, especialmente cuando las concentraciones extracelulares de Na⁺ son elevadas, entrando este, a través de transportadores proteicos de alta afinidad por el K⁺. (Fuentes et al, 2006).

Los excesos de iones de Na⁺ y Cl⁻ en las células vegetales pueden provocar cambios conformacionales de las proteínas estructurales, en el

potencial eléctrico de la membrana citoplasmática, canales y transportadores iónicos, pudiendo inducir la acumulación y biosíntesis de ácido absísico (ABA) en hojas y raíces de las plantas (Jia et al, 2002) e induciendo la acumulación de especies reactivas del oxígeno, indicando que el mejoramiento a la tolerancia de estrés salino, puede ser una consecuencia del mejoramiento a la resistencia al estrés oxidativo (Hernández et al, 2001).

La acumulación de iones en vacuolas es uno de las estrategias usadas por las plantas para la tolerancia al estrés salino, disminuyendo el volumen citoplasmático. La célula genera un Incremento en la osmolaridad para mantener la turgencia, requiriendo menos cantidades de solutos para mantener las concentraciones de potasio a un nivel alto. (Mimura, et al, 2003).

En condiciones de alta salinidad, la concentración iónica citoplasmática de las células de plantas se altera como resultado tanto de la absorción de Na^+ y Cl^- . Concentraciones de NaCl superiores a 0.3-0.5 M inhiben la mayoría de los enzimas, por un desbalance entre las fuerzas hidrofóbicas y electrostáticas que mantienen la estructura de las proteínas solubles y de membranas (Serrano, 1996; Hasegawa, et al, 2000; Serrano y Rodríguez, 2001; Zhu, 2001). Algunas de estas enzimas pueden ser sensibles a concentraciones bajas de Na^+ y Cl^- , de forma que la inhibición de su actividad puede ser determinante de la sensibilidad al estrés salino.

En plantas de *Citrus sinensis* (Bañuls y Primo, 1992) y soja (Abel, 1969), el NaCl y KCl son igualmente tóxicos, mientras que el NaNO_3 es menos tóxico, lo que indica que el componente tóxico de las sales es fundamentalmente el Cl^- . Por el contrario, en tomate (Rush y Epstein, 1981) y trigo (Gorham et al, 1990), el NaCl es más tóxico que el KCl , indicando que, en este caso, el componente tóxico de la sal es el Na^+ .

En suspensiones celulares de tabaco, se probaron concentraciones osmóticamente equivalentes de sorbitol, manitol, NaCl y KCl , las cuales provocaron una inhibición del crecimiento celular, mostrando mayor efecto en las células, el NaCl y KCl (LaRosa et al, 1985) lo que indica que, en parte, los efectos causados por estas sales son debidos al componente iónico.

La toxicidad del estrés salino sobre las membranas celulares, podría ser ocasionado por el desplazamiento de los iones Ca^{2+} por el Na^+ , asociados

a la membrana plasmática y sistemas endomembranarios (Lynch y Läuchli, 1988), ocasionando una alteración del homeostasis del Ca^{2+} intracelular (Läuchli, 1990, Rengel, 1992). Resultados posteriores han indicado que el estrés salino es percibido por la planta a través de un aumento transitorio de la concentración de Ca^{2+} citosólico (Sanders, et al, 1999; Knight, 2000), para facilitar su adaptación al estrés (Knight y Knight, 2001).

El trasplante de vitroplantas a suelos con concentraciones de 40 y 45 mM de NaCl tuvo efecto negativo en la sobrevivencia en las plántulas. Después de cuatro semanas de trasplantadas, todas las plantas presentaron amarillamiento de hojas y tallos y finalmente cambio de color a café, tanto en tallos como las hojas, presentando un olor desagradable en las raíces, olor característico de material en descomposición.

Materiales y métodos.

El genotipo, el tipo de explante y el picloram influyen en la inducción de masas proembriogénicas, callos y número de embriones en la especie *D. rotundata*. Por esto, para el establecimiento de la embriogénesis somática en *D. rotundata* se debe considerar el uso de hojas con pecíolo del cultivar alemán bajo el efecto de una concentración de 2 mg L⁻¹ de picloram. En este sentido, se demostró que es posible inducir masas proembriogénicas en el cultivar alemán con un porcentaje superior al 90%, lo cual constituye una base experimental para futuras investigaciones sobre la optimización de la embriogénesis somática en esta especie.

Ubicación geográfica. El estudio se realizó en el invernadero de la Corporación Universitaria del Caribe- CECAR, por un periodo de 3 meses. Localizado a 9°18'38.8 de latitud norte y 75°22'01.9 de longitud oeste, con una elevación de 190 m.s.n.m., el área presenta clima cálido muy seco, con temperaturas promedio de 31 a 35 °C, precipitaciones anuales de 1099 mm y humedades relativas de 76 a 84%

Material Vegetal. Para el establecimiento del ensayo se utilizaron segmentos de tubérculos de ñame espinoso cultivar botón. Comprados a agricultores de la región.

Sustrato para siembra. El sustrato se depositó en bolsas para vivero de 10 kg, conteniendo una mezcla de suelo y abono orgánico en proporción 70/30. Se establecieron tres tratamientos, 0, 40 y 45 mM

de NaCl, denominados T0, T1 y T2 respectivamente. Para obtener la concentración de sal planteada en cada tratamiento, la sal sodio, se adiciono y mezclo con la cantidad total de suelo para cada tratamiento y posteriormente se distribuyó en cada bolsa, para garantizar la salinidad, se midió la conductividad eléctrica en cada tratamiento, mediante el uso del equipo multiparámetro pro DSS.

Propagación del cultivo. La propagación a partir de tubérculos se realizó sembrando en cada bolsa de 10 kg 20 segmentos de tubérculos. Cada tubérculo se cortó en segmentos de 50 gramos aproximadamente, los cuales fueron desinfestados con un fungicida de ingrediente activo Azoxystrobin, perteneciente al grupo de los α -metoxiacrilatos (Nombre comercial Amistar 50 GW), asperjando las semillas picadas y posteriormente dejándolos secar a temperatura ambiente. Los segmentos o trozos de ñame fueron colocados uno por bolsa.

Semanalmente se realizaron mediciones en cada tratamiento, como son: altura de la planta a partir de que el brote alcanzara 2 cm aproximadamente, número de hoja desde la aparición del primer par. Finalmente se realizó el cálculo del porcentaje de brotación para los segmentos de tubérculos, (Africano, et al; 2015). Y se evaluó la conductividad eléctrica en 4 muestras tomadas a lo largo de la fase experimental.

Porcentaje de sobrevivencia de los brotes. Se determinó mediante la siguiente fórmula:

% sobrevivencia = $P_v / (P_v + P_m) * 100$ donde P_v - las plantas vivas y P_m - plantas muertas (Falcón, et al; 2015).

Fluorescencia de la clorofila. Con el fin de caracterizar el efecto y modo de acción del estrés por salinidad en el cultivo de ñame a la semana final de la fase experimental, se realizaron mediciones de la eficiencia fotosintética (F_v/F_m) con un Fluorímetro (Hansatech pocket PEA), tomando 3 hojas de cada planta en cada tratamiento, las cuales se colocaron en cámara oscura durante 20 minutos, para reducir la actividad del Foto Sistema II (PSII) a valores cercanos a 0, luego, se procedió a realizar las mediciones adaptando el equipo al clic conservando la condición de oscuridad de la hoja (Africano, et al; 2015).

Conductividad eléctrica del suelo. Se estableció siguiendo la metodología propuesta en el Manual de técnicas de análisis de suelo aplicada a la remediación de sitios contaminados (Linares, et al; 2006). Se preparó una pasta saturada con 40 gr de suelo de los tratamientos y 40 ml

de agua destilada, se dejó reposo durante 5 horas, transcurrido este tiempo se filtró y se midió la conductividad eléctrica con el equipo multiparametro pro DSS.

Diseño experimental. Los ensayos se realizaron bajo un diseño Completamente aleatorizado (DCA), con 3 tratamientos y 20 repeticiones, donde el tratamiento T0 fue el testigo, sin aplicación de NaCl, T1 correspondió a la aplicación de NaCl a una concentración de 40 mM de NaCl (4,0 ds/m) y el T2 con aplicación de NaCl a una concentración de 45 mM de NaCl (4.5 ds/m). La unidad experimental estuvo constituida por una planta. A los datos obtenidos se les realizó análisis de varianza (ANAVA) con una confianza del 95, mediante la aplicación del programa Infostat 2010 versión estudiantil.

Efecto de la salinidad en la propagación convencional por segmentos de tubérculos.

Se sembraron 60 segmentos de tubérculos de ñame opino, de los cuales, a los 39 días de la siembra de tubérculos, en suelos no salinos, se obtuvieron 19 brotados, y en los suelos con concentraciones de 40 y 45 mM de NaCl, se registraron 9 brotes a los 48 días y 4 brotes a los 53 días respectivamente.

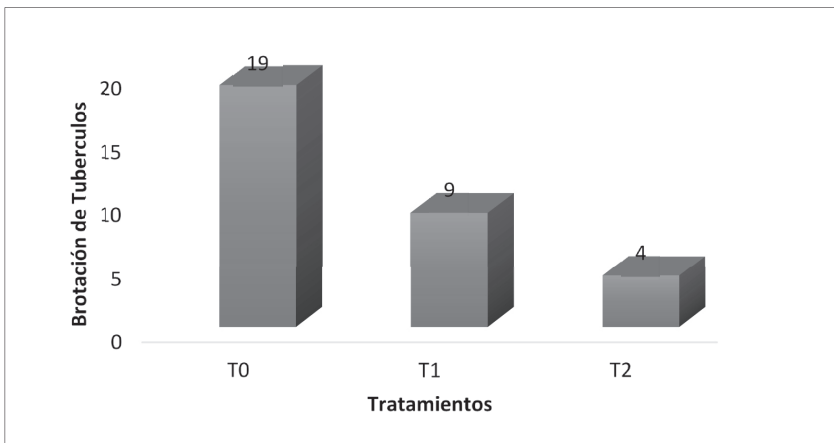


Figura 4. Número de tubérculos brotados en cada tratamiento, después de 39, 48 y 53 de la siembra en cada tratamiento.

Altura del tallo. El mayor promedio de altura, se registró en el tratamiento control T0, seguido del tratamiento T1 y finalmente el menor promedio en el tratamiento T2, con promedios de 85.7525, 29.5575, 5.2375 cm respectivamente (Figura 5).

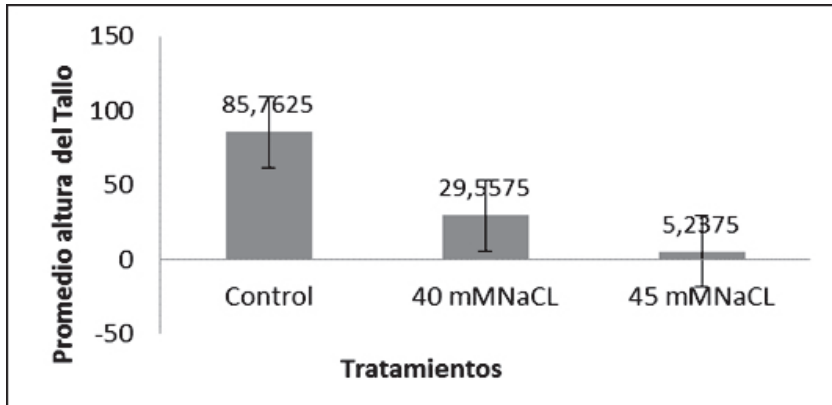


Figura 5. Altura del tallo de las plantas de (*Dioscórca rotundata*) registrado a los 7, 14, 21, 28, 35, 42, y 49, días de brotados en cada tratamiento.

Número de hojas. En los tratamientos control, T1 con 40 mMNaCL, y T2 45 mMNaCL, se observó que el número de hojas fue variable, mostrando el tratamiento control en promedio a las siete semanas de 9.04 hojas, mayor que en el tratamiento T1 y T2. Los cuales obtuvieron en promedio 3.05 y 0.38 hojas (Figura 6). Los datos obtenidos en los tres tratamientos son estadísticamente diferentes, el AVOVA arrojó un p-Valor < 0.05.

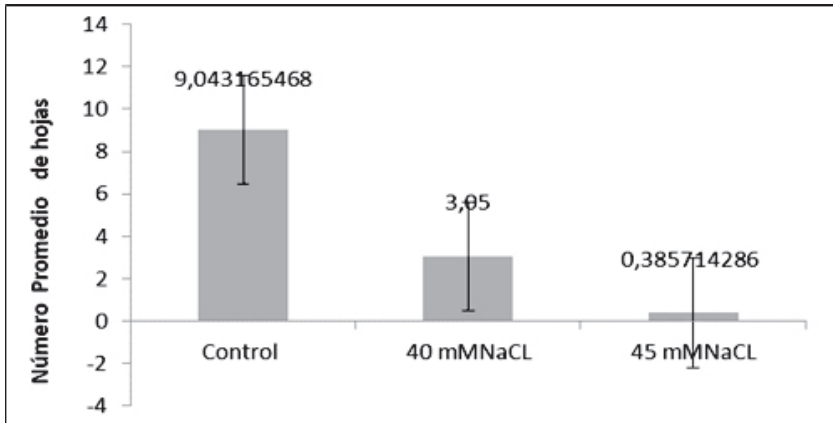


Figura 6. Promedio del número de hojas registrado en los tratamientos (control, T1 con 40 mMNaCl, y T2 45 mMNaCl) en los días 7, 14, 21, 28, 35, 42, y 49. Luego de la brotación de los tubérculos de *Dioscórrea rotundata*.

Porcentaje de sobrevivencia de los tubérculos de ñame espino (*dioscorea rotundata*).

Se analizó como variable respuesta el porcentaje de sobrevivencia de los tubérculos de ñame *Dioscorea rotundata* de cada tratamiento a los 49 días. Con respecto al tratamiento testigo en el que la brotación de los tubérculos se acerca a un 100%, los tratamientos con 40 mMNaCl y 45 mMNaCl en el suelo presentaron una disminución en la brotación de los tubérculos, con porcentajes del 40% y 20% respectivamente (Figura 7) datos que presentan diferencia significativa con $P \text{ valor} < 0.05$.

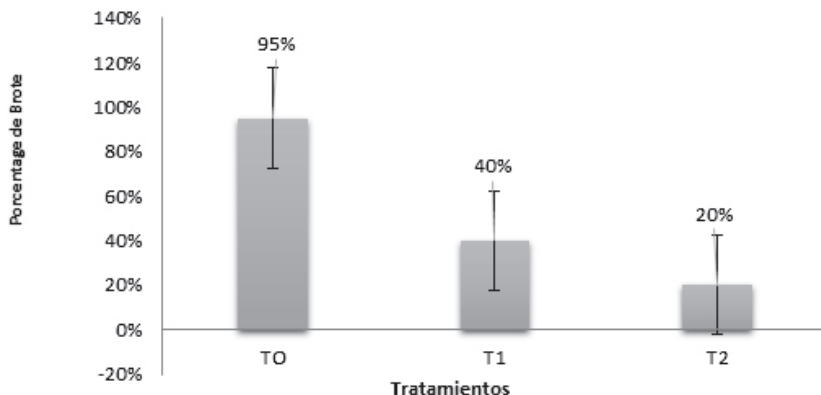


Figura 7. Porcentaje de Brote a los 49 días después de la siembra ñame (*Dioscórrea rotundata*) bajo condiciones de suelo salino.

Fluorescencia de la clorofila. Con la finalidad de evaluar las condiciones de estrés de las plantas de ñame (*Dioscórrea rotundata*), a los 49 días se midió la fluorescencia (Figura 8) de la clorofila en tres plantas de cada tratamiento T0, T1 y T2.

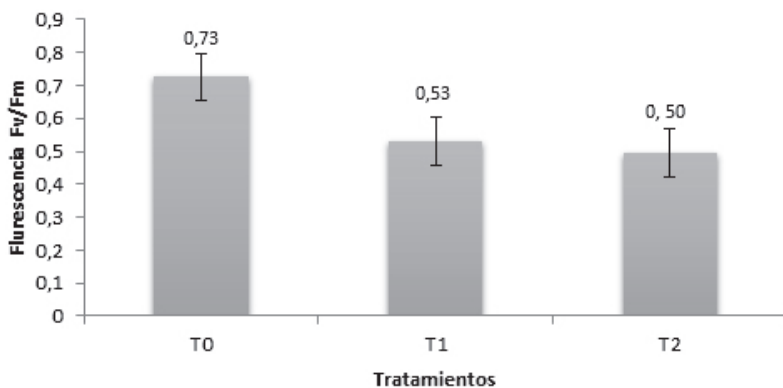


Figura 8. Eficiencia fotosintética (Fv/Fm), en plantas de ñame (*Dioscórrea rotundata*) sembradas bajo condiciones de salinidad.

Conductividad eléctrica de suelo salino. A lo largo de la fase experimental, se tomaron 4 muestras de suelo con el fin de monitorear el comportamiento del parámetro de conductividad (Tabla 2).

Tabla 2. *Conductividad eléctrica del suelo en cada tratamiento.*

MUESTRA	TRATAMIENTO	CONDUCTIVIDAD ds/m
1	T0	2,0
2	T0	1,5
3	T0	1,3
4	T0	2,1
1	T1	4,0
2	T1	4,3
3	T1	4,4
4	T1	4,0
1	T2	4,5
2	T2	4,6
3	T2	4,8
4	T2	4,5

Fuente: *cálculos del estudio*

La tendencia de la conductividad eléctrica de los tratamientos T0, T1 y T2. En el tratamiento T0 el promedio de las muestras fue de 1,72 ds/m, valor se encuentra por debajo de 4 ds/m por lo que se puede inferir que el tratamiento control, no tenía suelos salinos (Figura 9). El tratamiento T1 mantuvo los valores de conductividad por encima de 4 indicando salinidad en el suelo que equivalen a más o menos 40 mMNaCL los cuales, corresponden al valor agregado al suelo al principio de la investigación. El tratamiento T2 con 4.6 registro un valor superior que el tratamiento T1 que corresponde aproximadamente a 46 mMNaCL presentes en el suelo.

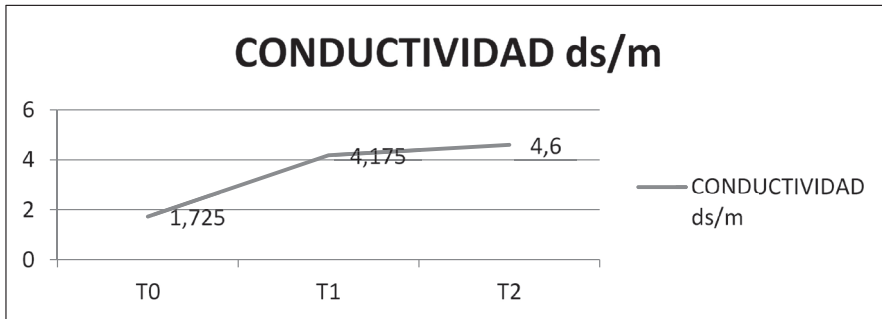


Figura 9. Conductividad eléctrica en ds/m presente en 4 muestras del suelo empleado para la siembra de los tubérculos, con el fin de evaluar la tolerancia de las plantas de ñame en suelos salinos, tomadas a lo largo del experimento.

Brotación de tubérculos de ñame (*dioscórrea rotundata*) bajo estrés salino

Según los resultados obtenidos y tomando como referencia el tratamiento control, la salinidad presente en el suelo del tratamiento T1 y T2 tuvo influencia en la brotación de tubérculos de *Dioscórrea rotundata*. En términos generales, cuando las plantas se encuentran bajo condiciones de estrés salino se presenta una ruptura de la homeostasis iónica de la planta gracias a la toxicidad causada por el sodio (Na^+) en el citoplasma y a su vez provoca una deficiencia de iones como el potasio; por otro lado las soluciones salinas afectan los procesos enzimáticos de la glicólisis, ciclo de Krebs y la fotofosforilación dando como resultado una menor disponibilidad de energía y adsorción de nutrientes (Mata-Fernández, et al; 2007).

Los datos obtenidos con respecto a la altura del tallo indican que la longitud de la planta fue afectada por la conductividad en los suelos de 4 ds/m para el tratamiento T1 y 4.5 ds/m en el tratamiento T2. La disminución en el tamaño de las plantas presentes en los tratamientos con 40 y 45 mMNaCl, puede estar relacionado con la disminución del potencial hídrico del suelo durante las primeras etapas de crecimiento (Mata-Fernández, et al; 2007), que interviene afectando la toma de agua por la planta, el efecto osmótico de los suelos salinos se refiere a altas concentraciones de sales que incrementan las fuerzas potenciales reteniendo el agua en la solución del suelo dificultando la extracción de esta por las raíces de las plantas (Mata-Fernández, et al., 2007), generando una variabilidad en la

toma de nutrientes gracias a la baja disponibilidad de agua y aumento en la concentración de elementos como Na^+ , Cl^- , (Leidi, et al; 2002). Estos datos concuerdan con lo descrito por Coca, et al; en el año 2012, quienes encontraron una reducción en la altura del pseudotallo de *Allium cepa* L., crecida bajo condiciones de salinidad de 90 mM de NaCl, de igual forma lo descrito por Manga et al; en 1988, que reportaron la disminución del el pseudotallo en plantas de cebolla con el aumento del nivel de salinidad en el suelo.

Es de anotar que dependiendo de cuál sea el catión predominante en el complejo de cambio Ca^{+2} o Na^+ del suelo; la concentración de sales confiere propiedades nocivas para los cultivos (Mata-Fernández, et al; 2007) sobre todo cuando alguno de estos se concentran en la zona radical de los cultivos generando valores muy altos en la presión osmótica del suelo con evidentes consecuencias en el desarrollo de la planta ocasionando la disminución del tamaño de la planta y por ende, la baja productividad (Sánchez-Bernal, et al; 2008).

El número de hojas fue otra variable afectada por la salinidad de los suelos según los datos registrados. Comparados con el tratamiento control con un promedio de 9,04 en la aparición de hojas en todas las repeticiones, el tratamiento T2 fue el más afectado con promedio de 0,38, anotando que el promedio para el tratamiento T1 fue de 3.05 menos que en el tratamiento control, pero mayor que el del tratamiento T2. La disminución en el número de hojas es variable con respecto al cultivo que se esté analizando y la concentración de salinidad a la que esté expuesto (Goykovic et al; 2007). En el caso del tomate, cuando se encuentra sometido a niveles de salinidad presenta reducción en el número de hojas y área foliar (Romero, et al; 2001). Esta respuesta, puede estar relacionada directamente con el desequilibrio osmótico que presentan las plantas al absorber más sodios y cloruros que agua, generando problemas de toxicidad y nutricionales que a su vez ocasionan problemas de crecimiento y desarrollo en el material vegetal (Yokoi, et al; 2002). De acuerdo con un estudio realizado por Lesmes et al; en el 2007, quien obtuvo mayor número de hojas en plantas de lechuga 'Batavia' (*Lactuca sativa* L.) establecidas sin adición de NaCl, indicando, que la salinidad afecta los procesos de división y expansión celular del tejido foliar, confirmado por Salisbury et al; 1992, quienes señalan que en plantas sometidas a ciertas condiciones pueden verse afectadas por limitantes que conducen a disminuir la división celular, el cual, es un proceso necesario para el crecimiento de órganos como las hojas. La reducción de la toma de potasio K^+ por las plantas y por ende la reducción de este elemento en los tejidos de las mismas, gracias al incremento de la salinidad en el medio que

favorece la toma de Na^+ que posteriormente retarda el transporte de K^+ a los brotes de la planta (relación Na^+/K^+) inactivan enzimas y disminuyen la síntesis de proteínas en las plantas (Azcón-Bieto, 2000).

Sobrevivencia de tubérculos de ñame (*dioscórrea rotundata*) al estrés salino

Según los datos obtenidos la salinidad tuvo un efecto negativo sobre la brotación de los tubérculos de *Dioscórrea rotundata*. Estos resultados muestran que el incremento de la salinidad del suelo redujo el porcentaje de brotación de los tubérculos (Garsaball, et al., 2007), según Dodd et al; en 1999, un incremento de la salinidad generalmente reducen de la germinación, proceso que puede estar relacionado con la absorción y acumulación de iones en la semilla o plántula, lo que concuerda con lo propuesto por Prisco, et al; 1970, quienes indican que un alto contenido de sales en el suelo, especialmente cloruro de sodio, puede inhibir la germinación a causa de la sequía fisiológica, disminución del potencial hídrico y aumento de la concentración de iones en el embrión generando efectos tóxicos.

Fluorescencia de la clorofila en plantas de ñame dioscórrea rotundata.

La medición de esta variable arrojó datos relacionados con el aparato fotosintético en relación con el estrés de las plantas a causa de la salinidad presente en el suelo. Tomando como punto de referencia la máxima eficiencia fotosintética con valor de 0.8 Fv/Fm (Magnusson, 1997), en los resultados obtenidos se evidencia la disminución de la eficiencia fotosintética en los tratamientos sometidos a estrés por salinidad, sin embargo, en condiciones in vivo la emisión de la fluorescencia de los sistemas fotosintéticos es cambiante según las condiciones ambientales a las que se encuentran sometidos, como son altas temperaturas, heladas, sequías, intensidad lumínica, deficiencia nutricional, salinidad, entre otros, los cuales afectan directa o indirectamente la función del PSII y por ende, modifica la emisión de la fluorescencia (Moreno, et al; 2008). La fluorescencia basal (F_0) es la que se emite cuando la QA (quinona, receptora primaria de electrones en el PSII) se encuentra completamente oxidada y por lo tanto los centros de reacción del PSII se encuentran abiertos, completamente necesario en la activación de las reacciones fotoquímicas (Mouget et al; 2002). La relación Fv/Fm , es “una estimación de la eficiencia cuántica máxima de la actividad fotoquímica del PSII cuando todos los centros de reacción del PSII están

abiertos” (Baker et al; 2004). Fv hace referencia a la fluorescencia máxima, mientras que Fv fluorescencia mínima; por lo tanto, una disminución en el Fv/Fm indica una reducción en la eficiencia fotoquímica del PSII y una perturbación o daños en el aparato fotosintético (Jiménez, et al; 2015). Es muy probable que la salinidad presente en el suelo de las plantas haya generado cierre estomático como primera respuesta al estrés (Jiménez, et al; 2015), asumiendo que el intercambio de gases con la atmósfera también se vio afectado ocasionando la disminución de CO₂ que generó saturación de electrones en el PSII (Africano, et al; 2015).

Conductividad eléctrica del suelo.

El parámetro de conductividad eléctrica del suelo se calculó con el fin de monitorear los cambios posibles presentados a lo largo de la investigación. Los valores obtenidos en este estudio evidencian un tratamiento sin salinidad y dos tratamientos con salinidad. Es necesario aclarar que la salinidad de los suelos agrícolas afecta directamente la productividad de los cultivos tolerantes a esta condición (Camacho, 2013). La salinidad del suelo se expresa en términos de conductividad eléctrica (CE), que indica la “velocidad con la que la corriente eléctrica atraviesa una solución salina, siendo ésta proporcional a la concentración de sales en la solución” (Mata-Fernández, et al; 2007). La conductividad eléctrica del suelo, se mide en milimhos por centímetro cúbico (mmhos/cm³) o decism (dSm⁻¹) (Basurto, et al; 2008). Un suelo es salino cuando el complejo coloidal presenta principalmente con sodio (Na⁺) determinado cuando la conductividad del extracto de saturación es mayor a 4 dSm⁻¹ a 25° C (Allison, et al; 1990). Dentro de las consecuencias generadas por la salinidad perjudican el desarrollo y la productividad de los cultivos (Mata-Fernández, et al; 2007).

Conclusiones.

- La salinidad de los suelos afecta negativamente el cultivo de ñame *Dioscórrea rotundata*, interviene en la brotación de las semillas, altura de la planta, y aparición del número de hojas.
- La salinidad de los suelos produce sequía fisiológica en plantas de *Dioscórrea rotundata*.
- La fluorescencia de la clorofila de las plantas de ñame *Dioscórrea rotundata*, se ve afectada a causa de la salinidad. A mayores valores de salinidad se presentan menores valores en la eficiencia fotoquímica Fv/Fm del PSII.

- Las plantas de ñame *Dioscórrea rotundata* no sobreviven en condiciones de suelo salino con conductividad eléctrica igual o mayor a 4 ds/m.
- La conductividad eléctrica del suelo es una medida de gran utilidad cuando se requiere establecer cultivos de *Dioscórrea rotundata* mediante el empleo de semillas o plantas generadas in vitro.

Referencias Bibliográficas

- Abang, M. M., Winter, S., Mignouna, H. D., Green, K. R., & Asiedu, R. (2003). Molecular taxonomic, epidemiological and population genetic approaches to understanding yam anthracnose disease. *African Journal of Biotechnology*, 2(12), 486-496.
- Africano Pérez, K. L., & Plinzón Sandoval, E. H. (2015). Comportamiento fisiológico de plantas de rábano (*Raphanus sativus* L.) sometidas a estrés por salinidad. *Conexión Agropecuaria JDC*, 4(2), 11-22.
- Amusa, N., Adigbite, A., Muhammed, S., & Baiyewu, R. (2004). Yam diseases and its management in Nigeria. *African Journal of Biotechnology*, 2(12), 497-502.
- Baker, N. R., & Rosenqvist, E. (2004). Applications of chlorophyll fluorescence can improve crop production strategies: an examination of future possibilities. *Journal of Experimental botany*, 55(403), 1607-1621.
- Camacho-Tamayo, J. H. (2013). Relación espacial entre la conductividad eléctrica y algunas propiedades químicas del suelo. *Revista UDCA Actualidad & Divulgación Científica*, 16(2), 401-408.
- Casierra-Posada, F., Ebert, G., & Lüdders, P. (2000). Efecto de la salinidad por cloruro de sodio sobre el balance de nutrientes en plantas de lulo (*Solanum quitoense*). *Agron Colomb*, 17(1-3), 85-90.
- Dodd, G. L., & Donovan, L. A. (1999). Water potential and ionic effects on germination and seedling growth of two cold desert shrubs. *American Journal of Botany*, 86(8), 1146-1153.
- Falcón Oconor, E., Rodríguez Leyva, O., & Rodríguez Matos, Y. (2015). Aplicación combinada de micorriza y FitoMas-E en plantas de *Talipariti elatum* (Sw.) Fryxell (Majagua). *Cultivos Tropicales*, 36(4), 35-42.

- Flowers, T. (2004). Improving crop salt tolerance. *Journal of Experimental botany*, 55(396), 307-319.
- Garsaball, J. A. L., Méndez, J. R., & Mayz-Figueroa, J. (2007). Efecto de la salinidad del suelo sobre la germinación de semillas de maíz de diferentes pesos en el oriente venezolano. *Revista Temas Agrarios*, 12(2).
- Jiménez-Suancha, S. C., & Balaguera-López, H. E. (2015). Fluorescence as an indicator of stress in *Helianthus annuus* L. A review. *Revista Colombiana de Ciencias Hortícolas*, 9(1), 149-160.
- Magnusson, G. (1997). Diurnal measurements of F_v/F_m used to improve productivity estimates in macroalgae. *Marine Biology*, 130(2), 203-208.
- Mata-Fernández, I., Rodríguez-Gamiño, M., López-Blanco, J., & Vela-Correa, G. (2007). Dinámica de la salinidad en los suelos.
- Moreno, S. G., Vela, H. P., & Alvarez, M. O. S. (2008). La fluorescencia de la clorofila a como herramienta en la investigación de efectos tóxicos en el aparato fotosintético de plantas y algas. *Revista de Educación Bioquímica*, 27(4), 119-129.
- Munns, R., & Tester, M. (2008). Mechanisms of salinity tolerance. *Annu. Rev. Plant Biol.*, 59, 651-681.
- Pinzón Gutiérrez, Y. A. (2014). Caracterización morfológica y molecular de *Colletotrichum gloeosporioides* aislado de ñame (*Dioscorea* spp.) y establecimiento de una escala de virulencia para su caracterización patogénica. Universidad Nacional de Colombia.
- Prisco, J. T., & O'LEARY, J. W. (1970). Osmotic and 'toxic' effects of salinity on germination of *Phaseolus vulgaris* L. seeds. *Turrialba*, 20(2), 177-184.
- Rhoades, J. D., Kandiah, A., & Mashali, A. M. (1992). The use of saline waters for crop production (Vol. 48): FAO Rome.
- Thurston, H. D. (1998). *Tropical plant diseases: American Phytopathological Society (APS Press)*.
- Tous Villareal, J. D. (2010). Caracterización morfológica y molecular del hongo *Colletotrichum* spp, agente causal de la antracnosis en ñame (*Dioscorea* spp) en los departamentos de Bolívar, Córdoba y Sucre.

Yokoi, S., Bressan, R. A., & Hasegawa, P. M. (2002). Salt stress tolerance of plants. JIRCAS working report, 23(01), 25-33.

CAPÍTULO 6

APLICACIÓN DE BIOFERTILIZANTE EN LA PROPAGACIÓN DE PLANTAS *IN* *VITRO* Y CONVENCIONAL DE ÑAME ESPINO CULTIVAR BOTÓN *DIOSCOREA* *ROTUNDATA. POIR*

Karol Liseth Rueda Concha¹⁶

Eder Durango Ballesteros¹⁷

¹⁶ Biólogo. Joven Investigadora CECAR

¹⁷ Ingeniero Agrónomo, Maestría en Biotecnología. Doctorado en Biotecnología Agrícola, mención Vegetal. Instructor Investigador en el SENA Programa SENNOVA

Introducción

En las últimas décadas, el cultivo de tubérculos ha desempeñado un papel importante en la dieta alimentaria sobretodo de los países en vía de desarrollo; se estima que para el 2020 más de 2 mil millones de personas de África, Asia y América Latina dependerán de estos cultivos como fuente de alimento. La producción comercial de *Dioscorea* sp., es de gran importancia en estos países, puesto que constituye una fuente rica en carbohidratos, fibra y proteínas (Chacón et al., 2005).

Existen más de 600 especies comprendidas dentro de la familia Dioscoreaceae, las cuales se encuentran distribuidas en regiones tropicales y subtropicales del mundo, algunas especies del género *Dioscorea* como *D. alata* L. y *D. rotundata*, son cultivadas para la producción de tubérculos almidonados conocidos como ñames (Alvis, Vélez & Rada-Mendoza, 2008; Méndez et al., 2013; Perea, 2000). Desde que esta especie se comenzó a cultivar por el hombre se ha propagado por tubérculos enteros, secciones de tubérculos o bulbillos aéreos. El uso continuado de este tipo de material vegetal de plantación tiene el inconveniente de que, al plantarse de un año para otro en campo, se puede infestar por microorganismos patógenos y perder calidad fisiológica y sanitaria (Cabrera et al., 2010).

En Colombia, existe una alta demanda en el consumo de este tubérculo principalmente en los habitantes de la costa Caribe, donde los mayores productores son los agricultores del departamento de Córdoba, la subregión de los Montes de María en los departamentos de Bolívar y Sucre, algunos municipios del departamento del Cesar y la Guajira (Álvarez, 2000). Debido a que esta práctica constituye la principal fuente de ingresos y de empleo rural en estas zonas, el cultivo y comercialización del ñame es realizado principalmente por pequeños medianos agricultores (Méndez et al., 2013).

La sostenibilidad de los sistemas agrícolas a largo plazo debe fomentar el uso manejo efectivo de los recursos internos de los agroecosistemas. En

este sentido, los fertilizantes biológicos constituyen un componente vital de los sistemas sostenibles ya que son un medio económicamente atractivo y aceptable de reducir los insumos externos y de mejorar la cantidad y calidad de los recursos internos (Mejía, 1994).

Entre los beneficios del uso de microorganismos en la agricultura están su capacidad de fijar nitrógeno, atmosférico, la descomposición de residuos orgánicos, la desintoxicación con plaguicidas, la supresión de enfermedades en las plantas, el aporte de nutrientes al suelo y la producción de compuestos bioactivos como vitaminas y hormonas que estimulan el crecimiento de las plantas (Terry Alfonso, Leyva & Hernández, 2005).

Considerando que el uso del sustrato adecuado y los nutrientes son importantes para el cultivo de ñame, se utilizaron diferentes concentraciones de un insumo biológico preparado a base de microorganismos con el fin de facilitar la absorción de los nutrientes necesarios para el crecimiento de las plantas sin producir daños adversos al medio ambiente, además, conservar la fertilidad y biodiversidad del suelo y permitir una producción a bajo costo (Armenta et al., 2010; Chirinos, Leal & Montilla, 2006).

Propagación de ñame.

Se utilizaron tubérculos de ñame espinoso, del cultivar botón *Dioscorea rotundata*. Poir. Los segmentos de tubérculos, fueron cortados de 50-60 gramos 24 horas antes de la siembra (Olalde Portugal & Aguilera Gómez, 1998), y desinfectados con un fungicida de ingrediente activo Azoxystrobin, perteneciente al grupo de los α -metoxiacrilatos (Amistar 50 GW). (Jiménez & Hernández, 2012). Los segmentos se sumergieron en tres concentraciones de un bioinsumo comercial (Terravite S21) a base de microorganismos (T0=0, T1=4 y T2=8 ml/Kg de suelo). Para garantizar la colonización de los microorganismos se realizó una aplicación del insumo por 4 semanas.

Luego de la siembra se observó brotación de los segmentos de tubérculos a los 37 días en todos los tratamientos (Figura 1), indicando que el uso de microorganismo no influye en la formación de brotes en el ñame, además se observó para los tratamientos T0 y T1 un porcentaje de germinación del 95% y para T2 un 100% de las semilla, datos que difieren de los reportados por Reyes et., al en el 2014 quienes reportaron que el uso de microorganismos benéficos tienen un efecto positivo en la germinación

de las semillas de *Echinocactus platyacanthus* (Castillo-Reyes et al., 2014); según Jiménez 2012, las semillas de ñame utilizan las reservas de las semillas durante las primeras etapas por lo que la humedad adecuada es indispensable para la germinación de las semillas (Jiménez & Hernández, 2012).

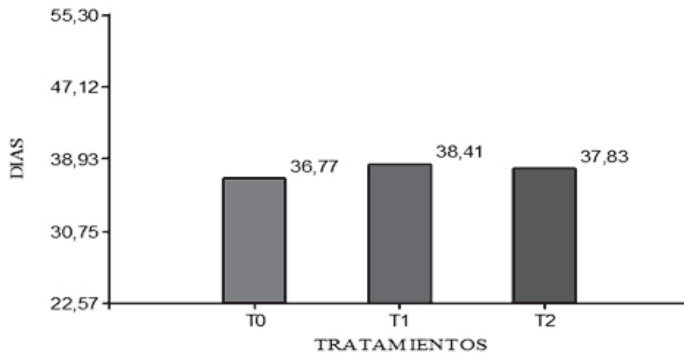


Figura 1. Tiempo promedio de germinación de las semillas.

Tabla 1. Análisis de varianza para el tiempo de brotación de las semillas de ñame.

Variables	TTO	Media Cuadrática	Error estándar	IC 95%		P(valor)
				Límite inferior	Límite superior	
Brotes	T0	36,773 a	1,258	34,259	39,28	0,643
	T1	38,409 a	1,258	35,895	40,923	
	T2	37,909 a	1,258	35,395	40,423	

**Para cada variable, medias cuadráticas con letra común no son estadísticamente diferentes $P > 0,05$*

Se realizaron mediciones de longitud del tallo para determinar crecimiento de la planta por tratamiento a través del tiempo (ver tabla 1). En los tres tratamientos se observó un aumento progresivo de tamaño lo que muestra que la planta estaba recibiendo los nutrientes necesarios para su crecimiento, sin embargo, no se encontró diferencias estadísticas entre tratamientos con respecto al crecimiento cada 7 días $P > 0.05$ (Tabla 2). Igualmente no se encontró diferencias estadísticas entre tratamientos y largo final del tallo, indicando hasta este punto que la incorporación de

microorganismos no produjeron un aprovechamiento del material orgánico del suelo, datos que contrasta con los reportados por Terry et., al (2005) quienes demostraron que las plantas de tomate inoculadas con algún microorganismo que estimule su crecimiento y desarrollo, presentan una mayor capacidad para absorber más eficientemente el agua y los nutrientes del suelo a través del estímulo provocado en el sistema radical, que se evidencia en el estado nutricional de las plantas; además según Bashan (1998), algunos microorganismos provocan una absorción más efectiva de los nutrientes, lo que explica la acumulación de compuestos nitrogenados en las plantas sin existir una aparente fijación biológica de nitrógeno (Bashan, 1998; Terry, Leyva Hernández, 2005); sin embargo Moreno Díaz (1998) encontró que el crecimiento a los 68 días del trasplante no mostraba diferencias significativas entre las plantas con y sin inoculación y que permaneció con la misma tendencia hasta 92 días (Moreno Díaz, 1988), probablemente en el caso del ñame ocurre lo mismo puesto que en las primeras etapas utiliza las reservas de las semillas. García (2003) encontró que los hongos micorrízicos confirieron un mayor efecto sobre la altura de plantas de chile mirasol, en el cual el mayor crecimiento registrado, fue en el cultivar de chile ancho, inoculado con *Glomus* sp., teniéndose un incremento del 8% (García, 2003).

Tabla 2. Análisis de varianza para el tamaño de las plantas de ñame. DPG: Días post germinación.

Tamaño DPG	TTO	Media cuadrática	Error estándar	IC 95%		P(valor)
				Límite inferior	Límite superior	
0	T0	2,386	0,161	2,064	2,709	0,504
	T1	2,405	0,161	2,082	2,727	
	T2	2,164	0,161	1,841	2,486	
7	T0	29,218	3,345	22,533	35,903	0,865
	T1	26,868	3,345	20,183	33,553	
	T2	28,905	3,345	22,220	35,589	
14	T0	78,755	6,493	65,779	91,730	0,421
	T1	76,959	6,493	63,983	89,935	
	T2	88,268	6,493	75,292	101,244	

Tamaño DPG	TTO	Media cuadrática	Error estándar	IC 95%		P(valor)
				Límite inferior	Límite superior	
21	T0	119,468	8,561	102,354	136,582	0,058
	T1	116,895	8,561	99,782	134,009	
	T2	144,090	8,561	126,574	161,607	
28	T0	160,655	10,634	139,405	181,904	0,212
	T1	154,232	10,634	132,982	175,482	
	T2	179,982	10,634	158,732	201,232	

P < 0,05 indican diferencias estadísticas entre tratamientos.

Área foliar total (aft).

Después de 90 días s de la siembra se determinó el número total de hojas por planta, escaneándolas y utilizando el software LEAFARE.EXE. Para calcular un promedio por planta de acuerdo con la siguiente formula: AFT= promedio área hoja x No de hojas totales. (Warnock et al., 2006).

Una mayor aplicación de microorganismos en el tratamiento 2, presentó una mayor área foliar lo que repercute en la fisiología de la plata puesto que es la capacidad de la cubierta vegetal para interceptar la radiación fotosintéticamente activa (RFA), la cual es la fuente primaria de energía utilizada por las plantas para la fabricación de tejidos y elaboración de compuestos alimenticios (Warnock et al., 2006), sin embargo al realizar el análisis estadístico no se encontró asociación entre algún tratamiento y el área foliar total $P > 0.05$ (Tabla 3), resultados que difieren a los encontrados por García en el 2003 quien encontró que la colonización de los hongos micorrízicos arbusculares influyen positivamente en la producción de Ácido Indolacético a los 80 y 120 días de edad, los cuales mejoraron el vigor de la planta, aumentaron la elongación del tallo y el crecimiento celular, lo que se reflejó en un mayor número de hojas y mayor área foliar (García, 2003).

Tabla 3. *Análisis de varianza para parámetros fisiológicos de las plantas de ñame. Germinación, AFT: área foliar total y Pero seco (MS).*

Variables	TTO	Media Cuadrática	Error estándar	IC 95%		P (valué)
				Límite inferior	Límite superior	
Brotación	T0	36,773 a	1,258	34,259	39,28	0,643
	T1	38,409 a	1,258	35,895	40,923	
	T2	37,909 a	1,258	35,395	40,423	
AFT	T0	852,415 a	162,457	498,452	1206,378	0,498
	T1	755,862 a	162,457	401,899	1109,825	
	T2	1031,067 a	162,457	677,105	1385,030	
MS	T0	9,152 a	1,171	6,600	11,704	0,247
	T1	8,764 a	1,171	6,212	11,316	
	T2	11,482 a	1,171	8,930	14,034	

**Para cada variable, medias cuadráticas con letra común no son estadísticamente diferentes $P > 0,05$*

Peso seco total de la planta

Se colectaron hojas, tallo y raíces. Todo el material vegetal se pesó y secó en estufa a 70°C por 48 horas, para determinar para cada órgano de la planta, el peso seco total (Mas-Golac, 2013).

El análisis de varianza mostró que no hay diferencia estadística entre tratamientos para esta variable (Tabla 3), lo que se debe probablemente a que el tiempo que duró el cultivo fue poco y era necesario esperar que la planta aprovechara en su totalidad los nutrientes del suelo. Resultados similares fueron reportados por Moreno Diaz (1988) quien no encontró diferencias significativas en el rendimiento de tubérculos de papa ni en el peso seco total en plantas con y sin inoculación en los primeros 90 días del cultivo (Moreno Díaz, 1988). Los resultados obtenidos difieren a los reportados por Bashan (1989) quien observó que en experimentos realizados con *A. brasilense*, obtuvieron un incremento de la masa fresca y seca de plántulas de tomate y en la elongación de las raíces en otros cultivos. Este resultado expresa la especificidad entre los exudados radicales de este cultivo y la rizobacteria *A. brasilense* (Bashan, 1998). Vander Zaag y col. (1982) informaron que, en los suelos de ese país, las raíces de ñame están fuertemente colonizadas con HMA y es por ello por lo que el cultivo utiliza el fósforo (P) eficientemente a bajos niveles en el suelo y las investigaciones

revelaron que el ñame responde a la inoculación con HMA (Vander Zaag et al., 1982).

Pigmentos fotosintéticos (clorofilas y carotenoides)

La determinación de clorofila total, A, B y carotenoides, se realizó según la metodología de Val, et. Al (1985), tomando 0,5 gr de hoja de la parte media de la planta, ésta se envolvió en papel filtro húmedo y en papel aluminio, se maceró con 5 ml de acetona al 80%, la mezcla se filtró y el extracto se aforó a 5 ml para hacer las lecturas de absorbancia relativa en el espectrofotómetro GENESYS 10s UV-VIS, a longitudes de onda de 662, 645 y 470 nm. El cálculo de los pigmentos fotosintéticos se realizó teniendo en cuenta las siguientes fórmulas (García, 2003; Val, Heras & Monge, 1985):

$$\begin{aligned} \text{Cla } (\mu\text{g/ml}) &= 10.8 \times \text{Abs } 662 - 0.75 \times \text{Abs } 645 \\ \text{Clb } (\mu\text{g/ml}) &= 19.02 \times \text{Abs } 645 - 3.98 \times \text{Abs } 662 \\ \text{Clt } (\mu\text{g/ml}) &= 6.83 \times \text{Abs } 662 + 18,27 \times \text{Abs } 645 \\ \text{Carotenoides } (\mu\text{g/ml}) &= 3.775 \times 479 - 0.21 \times \text{Clb} \end{aligned}$$

Los valores de la concentración de pigmentos fotosintéticos (Clorofila a, b, y total y carotenoides) de absorbancia se encontraron en las plantas con los tratamientos T0 y T2, y los carotenoides se encontraron en una menor concentración en los tres tratamientos. Al realizar el análisis de varianza se encontró diferencias estadísticas en la variable clorofila entre los tres tratamientos, estableciéndose una relación entre los tratamientos T0 y T2 como se indica en la Tabla 4. Datos similares son reportados por García (2003) quien encontró un efecto positivo en el contenido de clorofila total en plantas inoculadas con hongos micorrízico-arbusculares, comparado con las plantas sin inocular, con una diferencia del 10%. Sin embargo, Cruz Gutiérrez (2013) señaló que el contenido de clorofila total no presentó diferencias significativas entre las plantas de tomate de los diferentes tratamientos. Por otra parte, Lancheros (2012) encontró que las plantas del tratamiento testigo (sin micorrizas) mostraron mayores concentraciones de clorofilas en comparación con las plantas inoculadas, y que en el caso de los carotenoides no se encontró diferencias estadísticas entre tratamientos lo que indica que la presencia de microorganismos benéficos no está relacionada con la producción de pigmentos fotosintéticos en las plantas de agraz (*Vaccinium meridionale*) Swartz.

Tabla 4. *Análisis de varianza para parámetros clorofilas y carotenos. Cla: clorofila a, Clb: clorofila b, Clt: clorofila total, Caro: Carotenoides y LTF: longitud del tallo final en plantas de ñame.*

Variables	TTO	Media Cuadrática	Error estándar	IC 95%		P (value)
				Límite inferior	Límite superior	
Cla	T0	26,047 b	2,509	20,580	31,513	0,001*
	T1	14,663 a	2,509	9,197	20,130	
	T2	31,625 b	2,509	26,159	37,092	
Clb	T0	31,463 a	5,967	18,461	44,464	0,061
	T1	15,978 a	5,967	2,976	28,979	
	T2	37,843 a	5,967	24,842	50,845	
Clt	T0	49,334 ab	7,462	33,075	65,592	0,023*
	T1	26,059 a	7,462	9,801	42,317	
	T2	59,546 b	7,462	43,288	75,804	
Carotenos	T0	4,694 a	0,922	2,686	6,703	0,471
	T1	6,068 a	0,922	4,059	8,077	
	T2	6,174 a	0,922	4,165	8,182	
LTF	T0	292,520 a	32,445	221,828	363,212	0,393
	T1	346,600 a	32,445	275,908	417,292	
	T2	287,900 a	32,445	217,208	358,592	

**Para cada variable, medias cuadráticas con letra común no son estadísticamente diferentes $P > 0,05$.*

Es necesario realizar una prueba de comparaciones múltiples de las medias para las variables que presentaron diferencias significativas.

Conclusiones

Las fertilizaciones con microorganismos no influyen en algunos parámetros fisiológicos de las plantas de ñame como área foliar total, masa seca, longitud del tallo concentración de pigmentos fotosintéticos.

Referencias Bibliográficas

- Abang, M., Winter, S., Mignouna, H., Green, K., & Asiedu, R. (2003). Molecular taxonomic, epidemiological and population genetic approaches to understanding yam anthracnose disease. *African Journal of Biotechnology*, 2(12), 486-496.
- Acosta, R., & Beltrán, J. (2000). Estandarización de la Técnica de micropropagación para la obtención masiva de plantas de ñame espinoso (D.

rotundata) mediante el cultivo in vitro de segmentos nodales (Tesis de grado para optar el título de Biólogo), Universidad de Sucre, Sincelejo.

- Aguilar-Reyes, Z. I. (2012). Caracterización morfológica y molecular de la colección de *Dioscorea* spp. del Banco de Germoplasma del Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza (CATIE), Costa Rica. (Tesis como requisito para optar por el grado de Magister Scientiae en Agricultura Ecológica), Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza, Turrialba, Costa Rica.
- Agvik, E. (2011). Enraizamiento y Aclimatación de plántulas de Vainilla planifolia Andrews, provenientes de cultivo de tejidos con fines de conservación. (Informe de Tesis Para optar el título de Bióloga), Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia, Guatemala.
- Alberto Espinosa Cuéllar, Ruiz, L., Rivera, R., & Espinosa, E. (2015). Las micorrizas y su efecto en clones comerciales de yuca sobre suelo pardo mullido carbonatado. *Rev. Agricultura Tropical*, 1(2), 19-25.
- Allen, M. F., Moore, T. S., & Christensen, M. (1982). Phytohormone changes in *Bouteloua gracilis* infected by vesicular-arbuscular mycorrhizae. II. Altered levels of gibberellin like substances and abscisic acid in the host plant. *Canadian Journal of Botany*, 60(4), 468-471.
- Alvarez, A. (2000). Prácticas agronómicas para el cultivo del ñame. In M. y. B. Guzmán, G. (Ed.), *Ñame: producción de semilla por biotecnología*. Unibiblos, Bogotá. pp. 55-65.
- Alvis, A., Vélez, C., & Rada-Mendoza, M. (2008). Composición de ñames frescos cultivados en Colombia y sometidos a freído por inmersión. *Información Tecnológica*, 19(1).
- Amusa, N. (2000). Screening of cassava and yam cultivars for resistance to anthracnose using toxic metabolites of *Colletotrichum* species. *Mycopathologia*, 150, 137-142.
- Andresson, A. J., Rodriguez, P., & Guedes, E. (1994). Efectos de la inoculación con *Azotobacter* y hongos MVA en vitroplantas de ñame. *Cultivos Tropicales*, 15(3), 66.
- Armenta, A., García, C., Camacho, R., Apodaca, M., Montoya, L., & Nava, E. (2010). Biofertilizantes en el Desarrollo Agrícola de México. *Ra Ximhai*, 6(1), 51-56.

- Azcón-Aguilar, C., & Barea, J. M. (2007). Applying mycorrhiza biotechnology to horticulture: significance and potentials. *Scientia Horticulturae*, 68(1-4), 1-24.
- Barea, J. M., Azcón-Aguilar, C., & Roldan-Fijardo, B. (1984). Avances recientes en el estudio de la micorriza V-A. Formación, funcionamiento y efectos recientes en nutrición vegetal. *Anales de edafología y Agrobiología*, Granada, España. 659-677.
- Bashan, Y. (1998). Inoculants of plant growth-promoting bacteria for use in agriculture. *Biotechnology Advances*, 16(4), 729-770.
- Bethlenfalvai, G., & Schüepp, H. (1994). Arbuscular mycorrhizas and agrosystem stability. *Sustainable Agriculture and Natural Ecosystems*, 1-24.
- Bonilla, M., & Hernández, Ó. (2012). Propagación *in vitro* de ñame (*dioscorea* spp.): una perspectiva en la producción masiva de plántulas y conservación de germoplasma. *agron.*, 20(2), 65-76.
- Boutherin, D., & Bron, G. (1994). Multiplicación de plantas hortícolas. *Zaragoza*. pp. 225
- Cabrera, M., Gómez, R., Rayas, A., DeFeria, M., López, J., Medero, V., et al. (2010). Evaluación en campo de plantas de ñame (*Dioscorea alata* L.) obtenidas de los microtubérculos formados en Sistema de Inmersión Temporal. *Revista Colombiana de Biotecnología*, 12(1), 47-56.
- Calva, G., & Pérez, J. (2005). Cultivo de células y tejidos vegetales: la fuente de alimentos del futuro. *Revista Digital Universitaria*, 6(11).
- Castillo-Reyes, F., Sánchez Chaparro, J. D., Rangel Estrada, S. E., & Canul Ku, J. (2014). Efecto de microorganismos en la promoción de la germinación de semillas de la cactácea *Echinocactus platyacanthus* LINK & OTTO. *INTERCIENCIA*, 39(12), 863-867.
- Chacón, A. G., Gómez, L., Torres, S., & Saborío, F. (2005). Aclimatización de plántulas de yampí (*Dioscorea trifida*) y ñame (*D. alata*) producidas *in vitro*. *Agronomía Costarricense*, 29(3), 47-58.
- Chirinos, J., Leal, Á., & Montilla, J. (2006). Uso de Insumos Biológicos como Alternativa para la Agricultura Sostenible en la Zona Sur del Estado Anzoátegui *Revista Digital CENIAP HOY*, 11, 1-7.

- Cruz Gutiérrez, E. J. (2013). Estudio de la interacción de la simbiosis micorrízica arbuscular en plantas infectadas con Tobacco mosaic virus. (Tesis presentada como requisito parcial para obtener el grado de: Doctora en ciencias), Colegio de Postgraduados, Montecillo, Texcoco, Estado De México.
- Dehne, H. W., & Schönbeck, F. (1975). The influence of the endotrophic mycorrhiza on the fusarial wilt of tomato. *Journal of Plant Diseases and Protection*, 82(10), 630-632.
- Di Rienzo, J. A., Casanoves, F., Balzarini, M. G., Gonzalez, L., Tablada, M., & Robledo, C. W. (2011). InfoStat.
- Domínguez, G., & Donayre, M. L. (2006). Aclimatacion de *Uncaria tomentosa* (willd.) dc. producida in vitro. *Ecología Aplicada*, 5(2), 67-74.
- García, F. R. (2003). Concentración de reguladores del desarrollo vegetal inducida por hongos endomicorrízicos en dos cultivares de Chile (*Capsicum annuum* L.). (Tesis paa otener el grado de doctor en Ciencias, Área Biotecnología), Universidad De Colima, Colima-Mexico. (188)
- Gianinazzi, V., & Gianinazzi, S. (1981). Role of endomycorrhizal fungi in phosphorus cycling in the ecosystem. In: *The fungal community: its organization and role in the ecosystem*. In Wicklow (Ed.). New York.: D.T., C. Carrol, G.C. y Dekker, M. pp. 637-652
- González Muñoz, Y. d. C. (2003). Caracterización morfológica y molecular de genotipos de *Dioscorea alata* y *D. trifida* del Instituto de Investigación Agropecuaria de Panamá, IDIAP y CATIE, Costa Rica". (Tesis sometida a la consideración de la, como requisito parcial para optar por el grado de: Magíster Scientiae), Escuela de Posgrado de Educación para el Desarrollo y la Conservación del Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza, Turrialba, Costa Rica.
- González, M. (2012). El ñame (*Dioscorea* spp.). Características, usos y valor medicinal. Aspectos de importancia en el desarrollo de su cultivo. *Cultivos Tropicales*, 33(4), 5-15.
- González-Muñoz, Y. d. C. (2003). "Caracterización morfológica y molecular de genotipos de *Dioscorea alata* y *D. trifida* del Instituto de Investigación Agropecuaria de Panamá, IDIAP y CATIE, Costa Rica". (Tesis para optar por el grado de: Magíster Scientiae), Cen-

tro Agronomico Tropical De Investigacion Y Enseñanza-Catie, Turrialba, Costa Rica.

- Graham, J. H., & Menge, J. A. (1982). Influence of vesicular-arbuscular mycorrhizae and soil phosphorus on take-all disease of wheat. *Phytopathology*, 72(1), 95-98.
- Gribaudo, I., Novello, V., & Restagno, M. (2001). Improved control of water loss from micropropagated grapevines (*Vitis vinifera* cv. Nebbiolo). *Vitis*, 40(3), 137-140.
- IITA. (1976). International Institute Of Tropical Agriculture) Annual. Ibadan (pp. 80-81.).
- Jiménez, D., & Hernández, R. (2012). CULTIVO DE ÑAME (*Dioscorea alata* L.). In I. d. I. A. d. Panamá. & D. d. E. y. Publicaciones (Eds.), *MANUAL TÉCNICO*. Panamá: Instituto de investigación agropecuaria de panamá. pp. 36
- Lancheros, H. O. (2012). Caracterización de las micorrizas nativas en agraz *Vaccinium meridionale* Swartz y evaluación de su efecto sobre el crecimiento plantular. (Tesis presentada como requisito parcial para optar al título de: Magister en Ciencias Agrarias), Universidad Nacional de Colombia, Bogotá, Colombia.
- Mas-Golac, R. A. (2013). Aclimatación de plántulas de piñón (*Jatropha curcas* L.) propagadas *in vitro* en la estación experimental agraria El Porvenir Juan Guerra. (Para optar el título profesional de Ingeniero Agrónomo), Universidad Nacional de San Martín, Tarapoto.
- Mejía, M. (1994). *Agriculturas para la vida: movimientos alternativos frente a la agricultura química*. Cali, Colombia: Feriva 252.
- Méndez, Y., Palencia, J., Hernández, K., Hernández, E., & Beltrán, J. (2013). Reacción de genotipos de ñame (*Dioscorea* spp) a la antracnosis (*Colletotrichum gloeosporioides*). *TEMAS AGRARIOS*, 18(1), 34-40.
- Montaldo, Á. (1991). *Cultivo de raíces y tuberculos: Segunda edicion*, San Jose, Costa Rica, Instituto Interamericano de Cooperación para la Agricultura, 408p. pp.

- Moreno Díaz, P. (1988). Inoculación de micorrizas MVA en papa (*Solanum tuberosum*) respuesta en el crecimiento y nutrición de plantas inoculadas en invernadero y en campo. *Revista Latinoamericana de la Papa*, 1, 84-103.
- Olalde Portugal, V., & Aguilera Gómez, L. I. (1998). Microorganismos y Biodiversidad. *TERRA*, 16(3), 289-292.
- Onyeka, T. J., Péto, D., Ano, G., Etienne, S., & Rubens, S. (2006). Resistance in water yam (*Dioscorea alata*) cultivars in the French West Indies to anthracnose disease based on tissue culture-derived whole-plant assay. *Plant Pathology*, 55(5), 671-678.
- Perea, M. (2000). Utilización de los sistemas in vitro para la obtención de plantas de ñame (*Dioscorea* spp) libres de patógenos. Ñame: producción de semilla por biotecnología. Unibiblos, Bogotá, pp.
- Pierik, R. L. M. (1990). Cultivo in vitro de las plantas superiores. 3ª ed. Madrid, Ediciones Mundi-Prensa. pp. 326
- Potty, V. P. (1978). Occurrence of vesicular-arbuscular mycorrhiza in certain tuber crops. *Journal of Root Crops.*, 4(1), 49-50.
- Primitiva, L., Namur, J., Bollati, S., & Arce, O. (2010). Acclimatization of *Phalaenopsis* and *Cattleya* obtained by micropropagation. *Revista Colombiana de Biotecnología*, 12(2), 27-40.
- Quintero, I., Polo, J., Jarma, A., & Espitia, A. (2003). Enraizamiento in vitro de *Dioscoreas* sp. *Revista Colombiana de Biotecnología*, 5(2), 51-56.
- Reina, Y. C. (2012). El cultivo de ñame en el Caribe colombiano. Banco de la República – Sucursal Cartagena (168), 1-34.
- Ruiz Martínez, L. A., Simó González, J., Rodríguez Morales, S. J., & Rivera Espinosa, R. (2012). Las micorrizas en cultivos tropicales Una contribución a la sostenibilidad agroalimentaria pp. 246
- Ruiz-Perez, E. E. (2003). Severidad del complejo de enfermedades foliares en el cultivo de ñame (*Dioscorea alata* L.) en diferentes densidades de siembra y soportes vivos de madera negro [*Gliricidia sepium* (Jacq.) Walp] y su rentabilidad en Azuero, Panamá. (Tesis como requisito parcial para optar por el grado de: Magister Scientiae), Centro AgronomicoTropical de Investigación y Enseñaza, Turrialba, Costa Rica.

- Salazar, R., & Hoyos, R. (2007). Multiplicación y tuberización *in vitro* de ñame *Dioscorea alata* L. En sistema de inmersión temporal. *Fac. Nal. Agr.*, 60(2), 3907-3921.
- Terry, E., Leyva, Á., & Hernández, A. (2005). Microorganismos benéficos como biofertilizantes eficientes para el cultivo del tomate (*Lycopersicon esculentum*, Mill). *Revista Colombiana de Biotecnología*, 7(2), 47-54.
- Val, J., Heras, L., & Monge, E. (1985). Nuevas ecuaciones para la determinación de pigmentos fotosintéticos en acetona. *Estacion Experimental de Aula Dei, Zaragoza*, 17(1-2), 231-238.
- Vander Zaag, P., Fox, R., Kwaakey, P. K., & Obigbesan, G. O. (1982). Necesidades de fósforo de los ñames (*Dioscorea* spp.). *Información Express, Viandas, Hortalizas y Granos*, 6(3), 21-22.
- Warnock, R., Valenzuela, J., Trujillo, A., Madriz, P., & Gutiérrez, M. (2006). Área foliar, componentes del área foliar y rendimiento de seis genotipos de caraota. *Agronomía Trop.*, 56(1), 21-42.

CAPÍTULO 7

EVALUACIÓN *IN VITRO* DEL POTENCIAL PROBIÓTICO DE BACTERIAS NATIVAS EN TERNEROS ROMOSINUANO

Adrián Benito Revollo Pérez¹⁸
Jhoan Alonso Cardona Doria¹⁹

18 Biólogo. Especialista en Pedagogía ambiental. Maestría en Biotecnología

19 Biólogo. Maestría en Biotecnología. Profesor en la Universidad de Córdoba

Introducción

El ganado criollo Romosinuano (*Bos taurus*) debe su nombre a la carencia de cuernos (topo o romo) y lugar de origen, el Valle del río Sinú, costa norte de Colombia. Se le identifica como el criollo tipo carne, con uno de los mejores rendimientos en canal alrededor del 60% siendo la raza criolla colombiana la más apetecida en el exterior y además que constituye la base genética criolla de otras razas. La importancia del ganado criollo radica en la adaptabilidad lograda durante más de cuatro siglos: en su rusticidad, utilización eficiente de los alimentos bastos y pobres, fertilidad, resistencia y longevidad. (Bedoya et al., 2016; Pinzón, 1984).

Actualmente, la ganadería mundial afronta grandes oportunidades debido al aumento de la población mundial, la cual ya supera los 7500 millones de habitantes en el 2017 según el Fondo de Población de las Naciones Unidas (UNFPA, 2018). La participación de Colombia en la producción mundial de carne es solo del 1,4 %, ocupando el puesto doce entre los países de mayor producción de carne para el año 2013, y el tercer puesto en América latina detrás de Brasil y Argentina (FEDEGÁN-FNG, 2015). Sin embargo, se aleja cada vez más de los índices productivos de carne de los países industrializados tanto en volumen como en calidad, debido al manejo primario que se le ha dado a la parte nutricional de la ganadería en Colombia, haciendo que la producción de leche y carne sea ineficiente (Lombana et al., 2012).

El departamento de Sucre basa su economía principalmente en la ganadería y no es ajeno a la problemática nacional y al difícil entorno que ha caracterizado la producción agropecuaria y ganadera en la costa caribe en los últimos años. La mala calidad de los pastos de forraje y la contaminación de las aguas, hacen que disminuyan las colonias de bacterias benéficas presentes en el intestino del animal, que permiten desdoblarse los alimentos y mantenerlo saludable (FEDEGAN, 2014).

En la última década, se han desarrollado múltiples investigaciones con base en el estudio de dietas adecuadas que mejoren la nutrición en el animal. Los antibióticos son utilizados frecuentemente para eliminar microorganismos patógenos en animales de producción Bovina, con el propósito de prevenir o tratar enfermedades y favorecer el crecimiento del animal. Sin embargo, el problema del uso radica en que trazas quedan en la carne y en el suelo tras las deposiciones afectando la biota nativa del suelo causando graves daños ambientales. Otro efecto del uso de antibióticos es que elimina la microbiota intestinal benéfica del bovino, causando el mal funcionamiento de su sistema digestivo y produciendo deficiencias de minerales en los huesos y en los tejidos desarrollando mastitis, descalcificación, infertilidad posparto, retención de líquidos y tejidos de la placenta que producen endometritis, lo cual lleva a un alto índice de mortandad de cabezas de ganado al año, disminuyendo la producción de carne de buena calidad (Vargas et al., 2004). Como alternativa a estos problemas se ha sugerido el uso de probióticos para promover el balance de la microbiota intestinal y obtener mayor nivel de producción minimizando costos.

En este sentido, el uso de aditivos microbianos (Probióticos) constituye una alternativa viable para mantener la salud, promover el crecimiento en animales jóvenes, incrementar la eficiencia de utilización del alimento en el ganado vacuno; remplazar o reducir el uso de antibióticos, mejorar la calidad de la leche y carne; en general los aditivos microbianos según la World Health Organization (WHO) y Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO) (2001), son todos aquellos microorganismos vivos que al ser administrados en cantidades adecuadas, proporcionan o generan efectos benéficos a la salud del hospedero, llamados también probióticos. Los probióticos constituyen un grupo amplio de aditivos que incluye cultivos de bacterias y hongos (Carro et al., 2014).

Sin embargo, en Colombia los productos probióticos comercializados tienen un alto costo. Además, son importados por lo que los microorganismos contenidos en el producto no poseen la especificidad a la especie o al ambiente, constituyéndose en un factor importante que interfiere en la adhesión y colonización *in vivo* de los microorganismos probióticos (Frizzo et al., 2006). Como resultado los ganaderos no obtienen los beneficios esperados. Por estas razones, se hace necesario obtener microorganismos

probióticos nativos y específicos a la especie, con el fin de producir como alternativa biotecnológica natural un biopreparado o aditivo probiótico que mejore el metabolismo animal aumentando la proliferación de la microbiota ruminal, aumentando el flujo de proteína bacteriana y de ácidos grasos volátiles (AGV) que al ser metabolizados por el animal generan mayor ganancia de peso, lo cual ha sido siempre la meta para los productores ganaderos del departamento de Sucre. El presente estudio tuvo como objetivo evaluar las características probióticas in vitro de microorganismos nativos aislados de muestras de heces de terneros Romosinuano en el departamento de Sucre.

Metodología

Ubicación Geográfica: la fase de campo de este estudio se realizó en el departamento de Sucre en dos fincas pertenecientes a las subregiones del Morrosquillo y a la Subregión San Jorge en donde se seleccionaron terneros en etapa de levante entre 6 a 12 meses de raza Criolla Colombiana Romosinuano para posteriormente realizar el muestreo.

Recolección de muestras: se colectaron pool de heces bovinas en edades entre los 6 a 12 meses en pastoreo y sin ser tratadas con antibióticos por lo menos 3 meses antes. Inmediatamente las muestras fueron depositadas en matraces previamente esterilizados de 250 ml con una capa de aceite mineral estéril en anaerobiosis y se transportó al laboratorio de Biotecnología GRUBIODEQ de la Universidad de Córdoba (8° 47' 16.01" N, 75° 51' 28.08" W) para el aislamiento y caracterización de los microorganismos. (Lara y Cardona, 2013)

Aislamiento de los Microorganismos: a partir de las muestras recolectadas, se realizaron diluciones seriadas (10^{-1} hasta 10^7) en solución salina (NaCl al 0,85%) y se sembraron 0,1mL por placa utilizando medios selectivos, Agar de Man, Rugosa, Sharpe (MRS) para (*Lactobacillus* sp.) y Nutritivo modificado con CMC y Almidón al 0,1% (*Bacillus* sp), se incubaron durante 48 horas a $30 \pm 2^\circ\text{C}$ en atmósfera de dióxido de carbono (CO_2). Posteriormente, en cada cepa aislada se les realizó tinción de Gram y tinción de endosporas (método de wirtz). A partir de los resultados se subcultivaron las colonias hasta obtener cultivos puros, una vez obtenidos nuevamente se sembraron las colonias en 10 mL de caldo MRS y Nutritivo modificado para su crecimiento y conservación. (Lara y Cardona, 2013).

Evaluación *in vitro* de las características probióticas: a una concentración conocida inóculo (106 Ufc/mL) de cada uno de los microorganismos se les realizaron las siguientes pruebas:

- **Tolerancia a sales biliares:** el ensayo se realizó a diferentes concentraciones de sales 0,05; 0,1; 0,15 y 0,3%p/v a pH de 6,5±0,2; se inóculó 100µl de cultivo de los aislados, e incubó a 30°C por 48 horas; al cabo de este tiempo la sobrevivencia y resistencia a sales biliares se comprobó mediante la determinación del número de células viables (ufc/mL) (Ávila et al., 2010; Rondón et al., 2008).

- **Tolerancia a cambios de pH:** en cada uno de los caldos MRS y Nutritivo modificado, se le adiciono solución HCl (5%) para obtener variaciones de pH: 3,0; 4,0; 5,6 y 7,0±0,2; se tomó 1 mL de cada cultivo (concentración conocido de cepas a ensayar) y se inóculo en los medios, luego se incubo a 30°C durante 48 horas; pasado este tiempo se realizó conteo de células viables (Ávila et al., 2010; Rondón et al., 2008).

- **Tolerancia a altas concentraciones de NaCl:** en caldos MRS y Nutritivo modificado, se adicionó NaCl a diferentes porcentajes (2, 4, 6, 8 y 10%p/v) se inocularon 0,1 ml de inóculo a cada aislado de forma independiente e incubaron a 37°C durante 48 horas. Se evaluó el crecimiento mediante densidad óptica (DO) a 600nm en un espectrofotómetro Genesys 20. (Rondón et al., 2008).

- **Prueba de Antagonismo:** se evaluó el efecto antagónico de los aislados contra *E. coli* y *Salmonella* sp pertenecientes al banco de cepas del laboratorio GRUBIODEQ por el método de difusión en disco en Agar Mueller Hinton Modificado (Rubio et al., 2008; Mejía et al., 2007; Leiva et al., 2004).

- **Fermentación de la Glucosa:** los aislados que superaron las pruebas probióticas fueron inoculadas en tubos con caldo MRS y Nutritivo modificado con 0,2%v/v de una solución acuosa de purpura de bromocresol al 0,5% y Campanas de Durham invertidas para capturar y revelar la producción de gas. Después de la inoculación se incubaron a 37°C durante 48 horas y se evaluó el cambio de color y la presencia de gas (Rondón et al., 2008).

- **Crecimiento a 40°C:** se evaluaron las diferentes cepas que superaron las pruebas probióticas a temperatura de 40±2°C, durante 48 horas; la sobrevivencia y resistencia a esta temperatura se comprobó

mediante la determinación del número de células viables (ufc/mL) (Yimin et al., 2005).

Identificación Bioquímica de las Bacterias Nativas con Potencial Probiótico: para la identificación bioquímica de las cepas bacterianas 12M B1 (cocos Gram+) aislada en medio MRS, 12M N2 y 9M N3 (Bacilos Gram+) que superaron las pruebas probióticas se les aplicó la prueba de catalasa (Bergey's, 1994).

Identificación molecular de la cepa 12MB1 mediante amplificación y secuenciación del gen ribosomal 16S rRNA: mediante los resultados obtenidos tras las diferentes pruebas probióticas y tras las pruebas de identificación bioquímica, se seleccionó uno de los aislados bacterianos (12MB1) que presentó las mejores características probióticas in vitro y que resultó negativo a las pruebas de catalasa.

Extracción del DNA Genómico: para la extracción del DNA genómico se utilizó el kit comercial QIA amp® DNA Stool Mini Kit (QIAGEN Corporation). Siguiendo las instrucciones del fabricante.

PCR y Amplificación: para la PCR se utilizó la mezcla lista (PCR-100-2X) producida por CorpoGen y los iniciadores antes mencionados a una concentración 0.2 μ M. El volumen de la PCR fue de 50 μ L. Se amplificó por PCR una región de 1465 pb del gen ribosomal 16s, para esto se utilizaron los cebadores 27F (5'AGAGTTTGATCMTGGCTCAG3'), 1492R (5'TACGGYTACCTTGTTACGACTT 3') (Tajabadi et al., 2013).

Electroforesis: el ADN purificado y los productos amplificados por PCR se visualizaron en gel de agarosa al 1.5% (p/v) en tampón Tris-Acetato-EDTA y selección de los más concentrados para enviar a secuencia.

Purificación del fragmento amplificado: para la purificación se utilizó el KIT MinElute Gel Extraction Kit de QIAGEN Corporation. Siguiendo las instrucciones del fabricante. (QIAGEN).

Secuenciación del DNA: los productos de PCR una vez purificados fueron enviados para su secuenciación a la empresa MacroGen. (MacroGen Inc., Seoul, South Korea).

Análisis bioinformático: la secuencia obtenida fue ensamblada y alineada en una secuencia consenso problema en el programa MEGA versión 6.0, para la identificación del microorganismo aislado. El análisis taxonómico de la secuencia problema ensamblada, se realizó mediante la comparación con secuencias incluidas en las bases de datos GenBank de

NCBI (National Center for Biotechnology Information) y RDP (Ribosomal Database Project), teniendo en cuenta las puntuaciones de identidad y cobertura por encima del 94%. Se generó un árbol filogenético con el grupo de secuencias con mayor similitud a la secuencia consenso y la comparación con un grupo externo.

Conservación de la cepa probiótica: finalmente, las cepas identificadas con potencial probiótico se conservaron a -20°C con glicerol al 50 % como agente Crioprotector hasta su posterior utilización en busca de producir un biopreparado probiótico que mejore los sistemas productivos ganaderos del departamento de Sucre.

Diseño y análisis estadístico.

Se empleó un diseño completamente al azar (DCA), con tres repeticiones por tratamiento. Los resultados obtenidos se sistematizaron y analizaron en el software Statgraphics Centurion XVI. Se comprobó la homogeneidad de varianza por el método de Bartlett y el test de normalidad de Shapiro-wilk; luego, se realizó análisis de varianza (ANOVA) dentro de cada concentración y para cada cepa aislada, con el fin de comparar los tratamientos. Cuando hubo diferencias significativas se realizó la prueba de múltiples rangos por el método de Tukey al 95 % de confianza, además de métodos gráficos de representación de resultados.

Aislamiento de los microorganismos.

Se colectó un pool de heces bovinas de 10 individuos sanos hembras

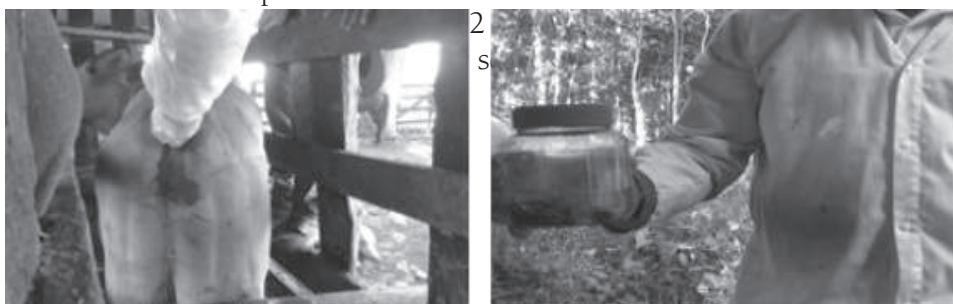


Figura 1. Recolección de muestras de un ternero en levante Romosinuano con 12 meses de edad (A). Matraz con aceite mineral estéril y pool de heces (B).

A partir de las muestras recolectadas, se lograron aislar y preseleccionar 5 cepas ácido lácticas (BAL) que crecieron tras diluciones de las muestras en medio MRS y 6 cepas de *Bacillus* sp que crecieron tras diluciones de las muestras en medio nutritivo suplementado con CMC y Almidón.

Evaluación in vitro de las características probióticas.

La Tabla 1, muestra los resultados de la evaluación in vitro de las características probióticas de las 5 cepas de bacterias ácido lácticas (BAL) y 6 cepas del género aisladas *Bacillus* sp de heces de terneros Romosinuano frente a diferentes concentraciones de sales biliares, pH y NaCl a 48 horas. De los resultados obtenidos, se hizo el análisis de varianza (ANOVA) dentro de cada concentración y para cada cepa aislada, con el fin de comparar los tratamientos. Cuando hubo diferencias significativas se realizó la prueba de múltiples rangos por el método de Tukey al 95 % de confianza.

Tabla 1. Promedio crecimiento ($\log_{10} \text{ufc/mL}$) de las cepas aisladas frente a las diferentes concentraciones de sales biliares; diferentes valores de pH y diferentes concentraciones de NaCl con intervalos de confianza del 95,0%.

CEPAS	[inóculo]	CONCENTRACIONES DE SALES BILIARES (%)					VALORES DE pH			CONCENTRACIONES DE NaCl (%)				
(Código)		0,05	0,10	0,15	0,30	3	4	5,6	7	2	4	6	8	10
12M B1	8,422	8,068 <i>b</i>	8,068 <i>b</i>	7,278 <i>abc</i>	8,5046 <i>a</i>	6,848 <i>ab</i>	5,442 <i>b</i>	7,998 <i>b</i>	7,903 <i>ab</i>	1,019 <i>ab</i>	0,919 <i>b</i>	0,345 <i>c</i>	0,284 <i>c</i>	0,193 <i>a</i>
12M B2	8,155	6,573 <i>abc</i>	6,573 <i>abc</i>	8,079 <i>abc</i>	6,065 <i>ab</i>	5,987 <i>ab</i>	2,566 <i>c</i>	8,213 <i>b</i>	8,098 <i>ab</i>	1,124 <i>b</i>	0,918 <i>b</i>	0,317 <i>c</i>	0,31 <i>ab</i>	0,184 <i>b</i>
9M B1	8,380	8,1 <i>b</i>	8,1 <i>b</i>	6,815 <i>abc</i>	7,974 <i>b</i>	0 <i>C</i>	6,894 <i>b</i>	8,210 <i>b</i>	8,226 <i>b</i>	0,374 <i>c</i>	0,335 <i>c</i>	0,245 <i>c</i>	0,215 <i>c</i>	0,182 <i>ab</i>
9M B2	8,473	3,236 <i>c</i>	3,236 <i>c</i>	8,325 <i>b</i>	0 <i>c</i>	6,205 <i>ab</i>	5,987 <i>b</i>	8,047 <i>b</i>	3,900 <i>c</i>	1,005 <i>ab</i>	0,901 <i>ab</i>	0,675 <i>ab</i>	0,359 <i>ab</i>	0,182 <i>ab</i>
9M B3	8,255	6,817 <i>abc</i>	6,817 <i>abc</i>	4,217 <i>ab</i>	6,778 <i>ab</i>	0 <i>c</i>	2,76 <i>c</i>	6,765 <i>c</i>	7,977 <i>ab</i>	0,873 <i>c</i>	0,634 <i>c</i>	0,303 <i>c</i>	0,14 <i>c</i>	0,13 <i>c</i>
12M N1	7,477	5,512 <i>abc</i>	5,512 <i>abc</i>	7,458 <i>abc</i>	7,032 <i>ab</i>	6,285 <i>ab</i>	5,321 <i>c</i>	8,241 <i>b</i>	7,220 <i>ab</i>	0,388 <i>c</i>	0,298 <i>c</i>	0,247 <i>c</i>	0,138 <i>c</i>	0,114 <i>c</i>
12M N2	8,430	8,25 <i>a</i>	8,25 <i>a</i>	8,190 <i>ab</i>	7,637 <i>ab</i>	7,012 <i>b</i>	7,151 <i>a</i>	8,376 <i>a</i>	8,581 <i>a</i>	0,379 <i>c</i>	0,29 <i>c</i>	0,163 <i>c</i>	0,137 <i>c</i>	0,107 <i>c</i>
9M N1	8,149	6,099 <i>abc</i>	6,09 <i>abc</i>	6,24 <i>abc</i>	4,52 <i>c</i>	0 <i>c</i>	0 <i>c</i>	0 <i>c</i>	8,091 <i>ab</i>	0,695 <i>c</i>	0,283 <i>c</i>	0,195 <i>c</i>	0,181 <i>c</i>	0,133 <i>c</i>
9M N2	8,255	6,260 <i>abc</i>	6,26 <i>abc</i>	6,304 <i>abc</i>	7,849 <i>ab</i>	5,636 <i>c</i>	6,166 <i>b</i>	8,313 <i>a</i>	8,312 <i>b</i>	0,342 <i>c</i>	0,295 <i>c</i>	0,153 <i>c</i>	0,131 <i>c</i>	0,126 <i>c</i>

9MN3	8,375	8,166 <i>b</i>	8,167 <i>b</i>	8,018 <i>abc</i>	8,28 <i>b</i>	7,229 <i>a</i>	7,149 <i>a</i>	8,157 <i>b</i>	8,391 <i>b</i>	0,534 <i>c</i>	0,441 <i>c</i>	0,406 <i>c</i>	0,176 <i>c</i>	0,124 <i>c</i>
9MN4	8,225	4,301 <i>c</i>	4,301 <i>c</i>	4,100 <i>c</i>	0 <i>c</i>	5,613 <i>c</i>	4,100 <i>ab</i>	6,763 <i>c</i>	4,619 <i>c</i>	0,312 <i>c</i>	0,292 <i>c</i>	0,3 <i>c</i>	0,257 <i>c</i>	0,127 <i>c</i>

No existen diferencias estadísticamente significativas entre aquellos niveles que compartan una misma columna de letras. El método empleado actualmente para discriminar entre las medias es el procedimiento de diferencia honestamente significativa (HSD) de Tukey. Con este método hay un riesgo del 5,0% al decir que uno o más pares son significativamente diferentes, cuando la diferencia real es igual a 0.

Tolerancia a sales biliares. En la Tabla 1 se evidencia que el crecimiento en promedio de las cepas aisladas no se vio afectado significativamente ($p < 0,05\%$) por las concentraciones de sales biliares empleadas, solo la cepa 12MB1 aislada en medio MRS, presentó el mayor crecimiento a sales biliares 0,3% incluso por encima de la concentración con 0% de sales biliares inoculada para las pruebas, lo cual indica que esta cepa ácido láctica no solo tolera sino que aumenta el número de células frente a concentraciones altas de sales biliares, características propias de la especie de cocos Gram+ de la especie *Enterococcus faecium*, cepa aceptada y utilizada a nivel mundial como aditivo probiótico en la alimentación animal.

Resultados similares obtuvieron Liong y Shah, (2005); Ahn et al., (2003), quienes observaron que algunas cepas de *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, *Lactococcus*, *Leuconostoc* y *Streptococcus* son capaces de producir la enzima conocida como sal biliar hidrolasa (SBH), que cataliza la hidrólisis de las sales biliares conjugadas en ácidos biliares, glicina y taurina. Dos aislados no presentaron crecimiento a sales biliares 0,3% correspondiente a las cepas 9MB2 y 9MN4 (tabla 1), lo que indica que a esta concentración el efecto detergente de las sales biliares inhibe por completo su crecimiento. Mientras el resto de las cepas presentaron un crecimiento variado en cada una de las concentraciones de sales biliares utilizadas en este estudio, pero en cada una de las concentraciones hubo diferencias significativas ($p < 0,05\%$), encontrándose que la cepa 12MN2 mostró mayor crecimiento a concentraciones de 0,05% y 0,1% de sales biliares. Prasad et al., (1998) indica al respecto que las diferencias en la tolerancia al tránsito gastrointestinal pueden deberse a las diferencias existentes en la estructura de la pared celular de las distintas especies y géneros.

Tolerancia a cambios de pH. La resistencia a bajos valores de pH y a las sales biliares es de gran importancia en la supervivencia y crecimiento de las bacterias en el tracto gastrointestinal, por lo que se considera como

prerrequisito para evaluar a las posibles cepas probióticas. Ng et al., (2015), sostiene que los microorganismos deben ser capaces de tolerar pHs bajos para asegurar su transición del estómago al intestino y una vez se encuentre en el intestino, tenga la capacidad de adherirse a las células epiteliales.

Con respecto al crecimiento de las cepas aisladas en los distintos pHs, en la tabla 1 se muestra que el crecimiento es afectado significativamente ($p < 0,05\%$) por los niveles de pH, resultado similar a los reportados por Ng et al., (2015) y Ávila et al., (2010). Las cepas 9MN3 y 12MN2 presentaron un crecimiento superior para los diferentes niveles de pH 3,0 y 4,0 con respecto al resto de cepas. De igual manera, la cepa 12MN2 aislada en medio Nutritivo modificado presentó los valores más altos de tolerancia a pH 5,6 y 7,0 ($p < 0,05\%$). Esto sugiere que el máximo crecimiento de ambas cepas se encuentra enmarcados en estos niveles de pH. La cepa 12MB1 correspondiente a una bacteria ácido láctica (BAL) se destacó dentro su grupo por presentar diferencias significativas a pH 3,0 respecto al resto de cepas BAL. Los aislados 9MB1, 9MB3, 9MN1 no presentaron crecimiento a pH 3,0. La cepa 9MN1 mostró menor tolerancia a los niveles ácidos de todas las cepas evaluadas, sin presentar crecimiento a los pH de 3,0; 4,0 y 5,6; sin embargo, experimentó un incremento significativo ($p < 0,05$) por encima del inóculo a pH 7,0. Lo anterior, es indicativo de una baja tolerancia de esta cepa a condiciones ácidas y óptimo crecimiento a condiciones de neutralidad. Todas las cepas presentaron un comportamiento similar en el crecimiento al definir tres grupos estadísticamente diferentes, los cuales corresponden a un mayor crecimiento para los niveles de pH 5,6 y 7,0 estudiados, similar al rango de pH óptimo del rumen el cual se sitúa entre 5,5 y 6,9 que podría sugerir la capacidad de estas cepas de alcanzar y colonizar esta área beneficiosa del animal (McSweeney y Mackie, 2012).

Los resultados obtenidos son similares a los reportados por Ng et al., (2015), quienes evaluaron el potencial probiótico de cepas ácido lácticas aisladas de un fermentado tradicional de Malasia llamado Bambang (Mangifera pajang), Estos autores proponen mejorar la tolerancia al ácido utilizando algunos protectores naturales dentro del producto consumido, tales como proteínas y grasas encontradas en muchos productos lácteos (Livney, 2010). Además, sostienen que la mayoría de los alimentos portadores de probióticos poseen pH mayor que 3,0. Por lo tanto, la ligera reducción de la viabilidad de las cepas ensayadas no afectaría su idoneidad para ser considerados probióticos.

Tolerancia a altas concentraciones de NaCl. Se obtuvo un efecto significativo ($p < 0,05\%$) de las diferentes concentraciones de NaCl sobre

el crecimiento de las cepas evaluadas, siendo el crecimiento de las cepas inversamente proporcional a las concentraciones de NaCl (tabla 1). A medida que aumentan la concentración de NaCl disminuye el crecimiento de los microorganismos. Sin embargo, todos los aislados mostraron tolerancia a las diferentes concentraciones de NaCl empleadas en este estudio. Los promedios más altos de densidad óptica a 600nm a la máxima concentración de 10% de NaCl los presentaron las cepas de bacterias ácido lácticas 12MB1 y 12MB2, hallándose diferencias estadísticamente significativas ($p<0,05$) con respecto a todas las cepas. Lo cual indica la capacidad que tienen estas cepas de adaptarse y sobrevivir a diferentes variaciones de NaCl y cambios de presión osmótica del rumen sin sufrir plasmólisis, ya que las concentraciones de 2% y 10% utilizadas en este estudio representan una osmolaridad entre 684 mOsm y 3400 mOsm respectivamente, lo cual según Van Lier y Regueiro (2008), la osmolaridad del líquido ruminal oscila entre 260 y 340 mOsm, pudiendo llegar a 400 mOsm con el consumo de concentrado. Por lo que este factor no afectaría significativamente a estos microorganismos a nivel de este órgano (Lara y Acosta, 2013).

Prueba de antagonismo. La actividad inhibitoria media (halos mm) de las cepas nativas aisladas frente a los patógenos *Salmonella* sp y *E. coli* se determinó por el método de difusión en disco en Agar Mueller Hinton (Rubio et al; 2008; Mejía et al; 2007; Leiva et al; 2004). Las cepas presentaron actividad antagónica frente a los patógenos *Salmonella* sp y *Escherichia coli*, en promedio hubo mayor actividad inhibitoria frente a *E. coli* que frente a *Salmonella* sp (Tabla 2). La capacidad antagónica hacia enterobacterias es uno de los criterios básicos para la selección de cepas para uso como probióticos en nutrición animal.

Tabla 2. Actividad antibacteriana de las cepas aisladas por el método de difusión en disco en Agar Mueller Hinton con su análisis de varianza (ANOVA).

CEPAS (Código)	Distancia de inhibición (mm) frente a patógenos bacterianos seleccionados	
	<i>Salmonella</i> sp.	<i>E. coli</i>
12M B1	4,866 <i>abc</i>	7,566 <i>abc</i>
12M B2	0 <i>c</i>	0 <i>c</i>
9M B1	0 <i>c</i>	0 <i>c</i>
9M B2	0 <i>c</i>	0 <i>c</i>

CEPAS (Código)	Distancia de inhibición (mm) frente a patógenos bacterianos seleccionados	
	<i>Salmonella sp.</i>	<i>E. coli</i>
9M B3	0 c	0 c
12M N1	6,533 abc	8,633 ab
12M N2	7,633 ab	6,6 c
9M N1	7,166 ab	7,0 c
9M N2	5,9 abc	8,3 ab
9M N3	6,666 abc	7,233 c
9M N4	6,366 abc	9,8 b
TOTAL	3.566	5,012

No existen diferencias estadísticamente significativas entre aquellos niveles que compartan una misma columna de letras. El método empleado actualmente para discriminar entre las medias es el procedimiento de diferencia honestamente significativa (HSD) de Tukey. Con este método hay un riesgo del 5,0% al decir que uno o más pares son significativamente diferentes, cuando la diferencia real es igual a 0.

Dentro del grupo de cepas ácido lácticas solo hubo actividad inhibitoria por la cepa 12MB1 frente a *E. coli* y mínima frente a *Salmonella sp.*, cepa destacada en superar las pruebas in vitro de tolerancia a pH, sales biliares y NaCl. Por otro lado, las cepas aisladas en medio nutritivo modificado mostraron poca actividad inhibitoria frente a los patógenos siendo la cepa 9MN4 quien presento el mayor diámetro inhibitorio frente a *E. coli*.

La acción antagonica de la cepa ácido láctica 12M B1 se asocia a la capacidad que tienen la mayoría de este tipo de bacterias ácido-lácticas, de producir sustancias antagonicas tales como el ácido láctico, acético y otros compuestos volátiles como ácidos grasos de cadena corta, peróxido de hidrógeno y bacteriocinas que favorecen a la reducción del pH del medio. Los bajos valores de pH son considerados como el principal factor en la inhibición del desarrollo de entero patógenos como *Salmonella sp.*, *Escherichia coli* y *Campylobacter sp.* (Fayol, 2005; Chaveerach et al., 2002). Además, la acidificación del lumen intestinal acelera las reacciones bioquímicas de la digestión (Pérez et al., 2005). Según Ahn et al., (2002), aquellas bacterias que sean capaces de inhibir el crecimiento

de microorganismos patógenos y además de crecer en condiciones de pH y concentraciones de sales biliares similares a las del tracto digestivo del animal, son microorganismos con características promisorias para su posterior empleo como probióticos.

Fermentación de la glucosa. A los aislados que superaron las pruebas probióticas de tolerancia a diferente pH, sales biliares, altas concentraciones de NaCl y actividad antagonista; se determinó la capacidad de fermentación de glucosa mediante la producción de gas a las 48 horas (figura 2).

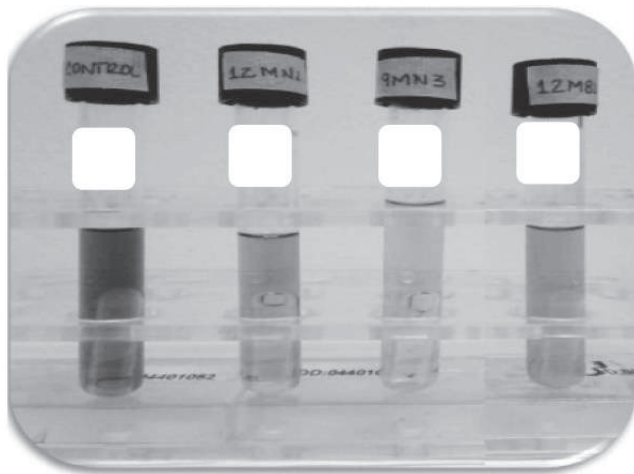


Figura 2. Capacidad de fermentación de glucosa por las cepas nativas tolerantes a pH, sales biliares, NaCl y con actividad antagonista: Control; 12M N2; 9M N3; 12M B1 de izquierda a derecha respectivamente.

Los resultados mostrados en la figura 2, indican que todas las cepas sometidas a esta prueba son capaces de fermentar la glucosa, pero utilizando vías metabólicas distintas, lo cual se evidencia por el cambio de color de púrpura a amarillo por parte de todos los tubos, pero solo se observa presencia de gas en dos de los aislados.

La bacteria ácida láctica 12MB1 (Tubo 4) fermenta la glucosa sin producción de gas, durante las 48 horas de incubación, demostrando una asimilación del carbohidrato; también evidenciando la ruta metabólica homofermentativa utilizada por este microorganismo. Esta característica reafirma la identificación de la cepa 12MB1 como perteneciente al género *Enterococcus* y posiblemente a la especie *Enterococcus faecium*. Al comparar sus características con las que se refieren en el *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology* y diferentes autores (Carro et al., 2014; Fisher

y Phillips, 2009; Klein, 2003) para esta especie, éstas coinciden en que no producen gas a partir de la glucosa, así como en la producción de ácido láctico como producto final. También se sustenta su selección como candidata de importancia para el desarrollo de aditivos con potencialidades probióticas (Brizuela et al., 1998) ya que los cultivos con esta propiedad son los más recomendados para ser utilizados como aditivos, por proporcionar a los alimentos mejores características organolépticas para el consumo humano y animal (Rondón et al., 2008).

Los otros dos aislados 12MN2 y 9MN3 correspondientes a dos aislados tipos bacilos, fermentaron la glucosa con producción de gas, esto nos dice que estas cepas pueden ser de mucha importancia para metabolizar el oxígeno residual que entra con los alimentos manteniendo una anaerobiosis en el rumen, lo cual favorecería al metabolismo microbiano anaerobio ruminal (Relling y Mattioli 2003).

Crecimiento a 40°C. Se evaluaron las diferentes cepas que superaron las pruebas probióticas a temperatura de $40\pm 2^\circ\text{C}$, durante 48 horas; mostraron que se ven afectadas significativamente ($p < 0,05$) disminuyendo drásticamente el número de células por mL, a excepción de la cepa 12MB1 (figura 3), quien presenta diferencias estadísticamente significativas frente al resto de cepas, ya que obtuvo la tasa de crecimiento más alta, nuevamente incluso por encima de los valores de crecimiento a temperatura ambiente.

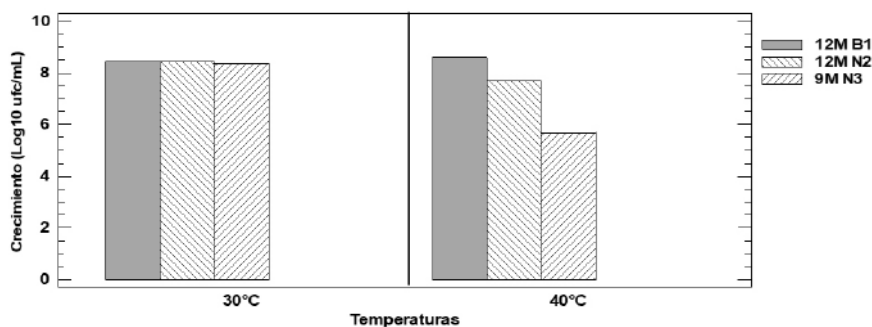


Figura 3. Tolerancia a alta temperatura $40\pm 2^\circ\text{C}$ por las cepas 12M B1; 12M N2 y 9MN3 expresado en $\log_{10}$ ufc/mL.

Esto indica la capacidad de esta cepa no solo de tolerar dichas condiciones de temperatura, sino que es capaz de reproducirse, lo cual es característico de las condiciones fisiológicas del género *Enterococcus* conforme a lo establecido por Carro et al., (2014).

Identificación bioquímica de las bacterias nativas con potencial probiótico.

La cepa 12MB1 caracterizada morfológicamente como un coco Gram+ (figura 4), frente a la prueba de catalasa (Bergey’s, 1994), dio negativo, propio del género *Enterococos*, las cepas 12MN2 y 9MN3 correspondientes a dos bacilos Gram+, resultaron catalasa positivo propio del género *Bacillus*. Estos resultados permiten seleccionar una de estas cepas bacterianas con potencial probiótico para ser identificadas mediante análisis molecular.

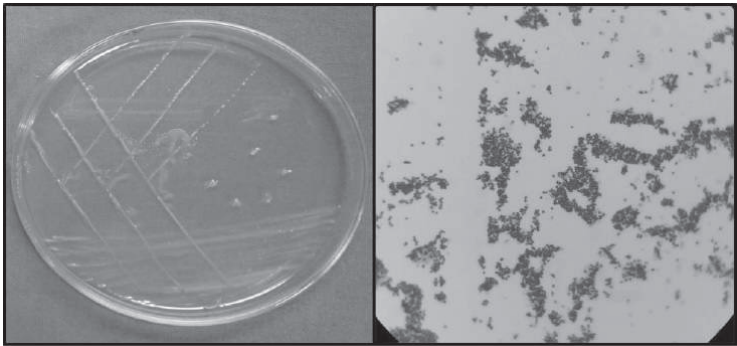


Figura 4. Observación macroscópica (A) y microscópica 100 x (B) de la cepa 12MB1 (*Enterococcus faecium*).

Identificación molecular de la cepa 12mb1 mediante amplificación y secuenciación del gen ribosomal 16s rrna.

Se seleccionó la cepa bacteriana ácido láctica 12MB1, que obtuvo los mejores resultados en las pruebas probióticas *in vitro*, y se amplificó una región de 1465 pb del gen ribosomal 16s, con cebadores 27F (5’AGAGTTTGATCMTGGCTCAG3’), 1492R (5’TACGGYTACCTTGTTACGACTT 3’) (Tajabadi et al., 2013), utilizando un programa de amplificación (Tabla 3).

Tabla 3. Programa de amplificación

Desnaturalización inicial	94°C	4 min	35 ciclos
Desnaturalización	94°C	30 seg	
Anillaje	55°C	35 seg	
Extensión	72°C	90 min	
Extensión final	72°C	10 min	

La secuenciación del ADN amplificado a partir de la cepa ácido láctica 12MB1 resultó en una secuencia de 1460pb, se pudo determinar su taxonomía por medio del clasificador de RDP (Ribosomal Database Project) (tabla 4). La secuencia corresponde a un microorganismo perteneciente al género *Enterococcus* con un 100% de confianza.

Tabla 4. Clasificación taxonómica de la cepa 12MB1 según la base de datos RDP.

Domain:	Bacteria
Phylum:	Firmicutes
Class:	Bacilli
Order:	Lactobacillales
Family:	Enterococcaceae
Genus:	Enterococcus

Al hacer el análisis en la base de datos GenBank, se encontró que dicha secuencia correspondía en específico a la especie *Enterococcus faecium* con una identidad del 99% y una cobertura del 100%, así mismo presentó alta homología con la especie *Enterococcus hirae* con una identidad y cobertura del 99%.

En este sentido, cómo no se tenía claridad de a qué especie correspondía el aislado, se procedió a realizar la reconstrucción filogenética; para esto, se tomaron 8 de las secuencias que presentaron mayor similitud con la secuencia consenso problema y una secuencia patógena como grupo externo. Se construyó un alineamiento múltiple en el programa bioinformático Mega versión 6.0, arrojando una matriz de distancia a partir de la cual se realizó el análisis filogenético por el método de Máxima Similitud (Maximum Likelihood), la historia evolutiva se dedujo mediante el método de Máxima Similitud basado en el parámetro modelo Kimura 2 (Kimura M. 1980).

Se obtuvieron automáticamente los árboles iniciales para la búsqueda aplicando algoritmos de Neighbor-Join y BioNJ a una matriz de distancias de pares estimados utilizando el método de máxima probabilidad compuesta (MCL) y seleccionando la topología con valor de probabilidad de log superior. Se utilizó una distribución Gamma discreta para modelar las diferencias de velocidad evolutiva entre los sitios (2 categorías (+ G, parámetro = 0,3078)). El análisis involucró 10 secuencias de nucleótidos. Las posiciones de codón incluidas fueron 1^a + 2^a + 3^a + no codificante.

Había un total de 879 posiciones en el conjunto de datos final. Los análisis evolutivos se realizaron en MEGA 6 y el árbol filogenético construido a partir de los 8 mejores “hits” con respecto a la base de datos GenBank del NCBI se muestra en la siguiente figura 15. (Tamura et al., 2013).

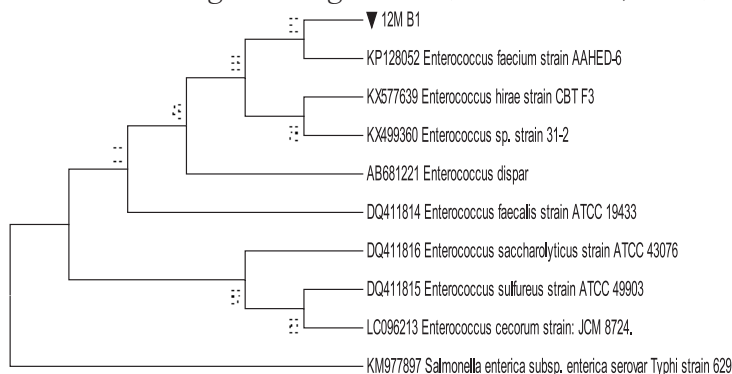


Figura 5. Árbol de distancias construido a partir de los 8 mejores “hits” con respecto a la base de datos GenBank del NCBI.

A partir del resultado obtenido tras realizar el análisis filogenético molecular por el método de Máxima Similitud basado en el parámetro modelo Kimura 2 (Kimura M. 1980). Se concluye que la cepa nativa 12M B1 quien mostró potencial probiótico *in vitro* corresponde su secuencia de 1460 pb a una cepa de la especie *Enterococcus faecium* con un 99% de identidad y 100% de cobertura. De igual manera, se encontró que presenta un 92% de similitud filogenética con la especie KP128052 *Enterococcus faecium* strain AAHED-6 registrada en la base de datos GenBank del NCBI.

La especie *Enterococcus faecium* encontrada en el presente estudio pertenece al género de los *Enterococcus* quienes se encuentran en diversos nichos ecológicos incluyendo productos lácteos, donde desempeñan un papel reconocido en características organolépticas (Giraffa, 2002). También son conocidos por producir una o más bacteriocinas que inhiben una amplia gama de patógenos transmitidos por los alimentos, incluyendo *Listeria* spp. Esta característica parece tener un impacto en la competencia de nichos y contribuyen al control de las infecciones patógenas (Nes et al., 2014).

Los *Enterococcus* son habitantes naturales del intestino de los mamíferos y especialmente de la parte terminal del intestino delgado (Lebreton et al., 2014; Walter y Ley, 2011). Este segmento del intestino es también el portal de entrada de varias bacterias patógenas tales como *Salmonella* y *Listeria*. Varios grupos han examinado la posibilidad de reducir la incidencia de estas infecciones utilizando cepas productoras de

bacteriocinas como *Enterococcus mundtii* CRL 35 (Salvucci et al., 2011), *Lactococcus lactis* DPC 6520 (Dobson et al., 2011) o *Pediococcus acidilactici* UL 5 (Dabour et al., 2009). La producción in situ de bacteriocinas parecen proporcionar protección contra microorganismos patógenos y potencian la competencia de nichos gastrointestinales en los mamíferos (Mejía et al., 2015). *Enterococcus faecium* LCW 44, exhibió un amplio espectro de actividad antagónica contra *Listeria* spp. (Vimont et al., 2017) *Enterococcus durans* 61A, aislado de la leche fermentada artesanal en Túnez, mostró un potente efecto antagónico frente a *Listeria*, se demostró que esta cepa está libre de genes de virulencia; resultó sensible a la Vancomicina y además mostró gran capacidad de sobrevivir bajo condiciones gastrointestinales simuladas (Hanchi et al., 2016).

En otros estudios, Saelim et al., (2012) reportaron a la cepa *Enterococcus faecium* CE5-1 como probiótica y propusieron su uso en el control de Enterococos resistentes a los antibióticos en pollos. Lan y Kim (2017) encontraron que la cepa *Enterococcus faecium* DSM 7134 mejoró la producción de ácidos grasos volátiles (AGVs), aumentó la maduración de la estructura intestinal por aumento de las vellosidades, alivió el estado antioxidante al aumentar el superóxido dismutasa, glutatión peroxidasa y glutatión, así como la disminución de la concentración de malonaldehído. También reportaron el aumento de *Lactobacillus fecal* y disminución de recuentos de *E. coli*, así como disminución de la puntuación de diarrea en los cerdos de destete. De igual manera, Tiantong et al., (2015) realizaron infusiones intramamarias con *Enterococcus faecium* SF68 en vacas Holstein y encontraron que esta cepa tiene un gran potencial para uso intramamario como fórmula para proteger mejor las glándulas mamarias contra la invasión de patógenos inminente tras la estasis de leche y promover una involución eficiente de la glándula mamaria en comparación con los antibióticos comerciales.

Es importante destacar que *Enterococcus faecium* fue reconocido en Brasil como microorganismo probiótico y su uso ha sido autorizado por la Agencia Reguladora de Salud (ANVISA). En Dinamarca, leche fermentada que contiene probióticos de *E. faecium* Se comercializa (Tamime, 2002) en Estados Unidos una cultura probiótica bajo el nombre de Causido, (MD Foods, Odense, Dinamarca), que es la combinación de culturas de *S. thermophilus* y *E. faecium* (Hanchi, 2003). La especie *Enterococcus faecium* es entonces, una de las cepas con mayor número de investigaciones, se ha aislado de diferentes animales y del ser humano, es aceptada en todo el mundo como cepa probiótica y su aplicación como aditivo microbiano en la alimentación bovina demuestran efectos beneficiosos en el tratamiento

frente a cepas resistentes a antibióticos y patógenos, producción de AGVs, maduración de la estructura intestinal, disminución de la diarrea, mejor respuesta del sistema inmune, entre otras.

En este sentido, podemos afirmar que la cepa 12MB1 identificada mediante biología molecular como *Enterococcus faecium* aislada de heces de terneros en levante Romosinuano, posee gran potencial probiótico *in vitro* y resulta promisorio para su uso como aditivo microbiano en la alimentación bovina.

Conclusiones

En esta investigación se logró determinar 3 cepas con potencial probiótico, correspondiente a una cepa ácido láctica (12MB1) y dos cepas tipo *Bacillus* sp. (12MN2 y 9MN3). Estas cepas mostraron la mayor tolerancia a las condiciones del tracto gastrointestinal simuladas en este estudio; destacándose la cepa 12MB1 identificada mediante biología molecular como *Enterococcus faecium* quien toleró todas las pruebas probióticas *in vitro*, con diferencias estadísticamente significativas a sales biliares 0.3% y crecimiento a 40°C. La cepa nativa con potencial probiótico *in vitro* *Enterococcus faecium* aislada de terneros Romosinuano en este estudio, constituye una alternativa biotecnológica para la producción futura de un biopreparado o aditivo probiótico para la alimentación bovina del departamento de Sucre.

Referencias Bibliográficas

- Ahn, Y. T.; Kim, G. B.; Lim, K. S.; Back, Y. J.; Kim, H. U. 2003. Desconjugation of bile salt by *Lactobacillus acidophilus* isolates. *International Dairy Journal* 13, 303-311.
- Ávila J., Ávila M., Tovar, B., Brizuela, M., Perazzo, & Hernández H. (2010). Capacidad probiótica de cepas del género *Lactobacillus* extraídas del tracto intestinal de animales de granja. *Revista Científica Universidad de Zulia-Venezuela*, Núm. 2, p. 161-169.
- Balance y perspectiva del sector ganadero (2015). Federación Colombiana de Ganaderos – FEDEGAN y Fondo Nacional del Ganado – FNG. Recuperado de <http://www.fedegan.org.co/estadisticas/publicaciones-estadisticas>.

- Bedoya, G., Carvajal, L. G., Bermúdez, N. R., Moreno, F. L., Márquez, M. E., Davies, S., & Ruiz, A. (2016). Estructura molecular y poblacional del ganado criollo Colombiano (GCC). *Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias*, 14(2), 109-120.
- Bergey's (1994). *Manual of determinative Bacteriology*. 9 edition. Edited by John G. Holt Copyright Williams y Wilkins, Baltimore. New York; EE.UU; ISBN 0-683-00603-7.
- Brizuela, M. A., Serrano, P., Pérez, Y., Iglesias, I., Rodríguez, R., & Zuaznábar, Z. (1998). Evaluación preliminar de cepas de bacterias ácido lácticas para su uso en la obtención de probióticos. *Revista LABORAT-Acta*, 2, 55-58.
- Carro Travieso, M. D., Saro, C., Mateos, I., Díaz, A., & Ranilla, M. J. (2014). Presente y perspectivas de futuro en la UE del empleo de probióticos en la alimentación de rumiantes. *Ganadería*, 15(93), 40-46.
- Chaveerach, P., Keuzenkamp, D. A., Urlings, H. A., Lipman, L. J., & Van Knapen, F. (2002). In vitro study on the effect of organic acids on *Campylobacter jejuni/coli* populations in mixtures of water and feed. *Poultry science*, 81(5), 621-628.
- Dabour, N., Zihler, A., Kheadr, E., Lacroix, C., & Fliss, I. (2009). In vivo study on the effectiveness of pediocin PA-1 and *Pediococcus acidilactici* UL5 at inhibiting *Listeria monocytogenes*. *International journal of food microbiology*, 133(3), 225-233.
- Dobson, A., Crispie, F., Rea, M. C., O'Sullivan, O., Casey, P. G., Lawlor, P. G. & Hill, C. (2011). Fate and efficacy of lacticin 3147-producing *Lactococcus lactis* in the mammalian gastrointestinal tract. *FEMS microbiology ecology*, 76(3), 602-614.
- FAO/WHO. Working Group on Drafting Guidelines for the Evaluation of Probiotics in Food. London Ontario, (Canada): 2002, 11p.
- Fayol-Messaoudi, D., Berger, C. N., Coconnier-Polter, M. H., Lievin-Le Moal, V., & Servin, A. L. (2005). pH-, Lactic acid-, and non-lactic acid-dependent activities of probiotic *Lactobacilli* against *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium. *Applied and environmental microbiology*, 71(10), 6008-6013.
- Federación Colombiana de Ganaderos- FEDEGAN, (2014). Plan de desarrollo ganadero 2014-2019. Bogotá D.C. p 328.

- Fisher, K., & Phillips, C. (2009). The ecology, epidemiology and virulence of *Enterococcus*. *Microbiology*, 155(6), 1749-1757.
- Fondo de población de las naciones unidas (UNFPA) (2018). Total population in millions. Recuperado de <https://www.unfpa.org/es/data/world-population-dashboard>.
- Frizzo, L. S., Soto, L. P., Bertozzi, E., Sequeira, G., Marti, L. E., & Rosmini, M. R. (2006). Evaluación *in vitro* de las capacidades probióticas microbianas orientadas al diseño de inóculos probióticos multiespecie para ser utilizados en la crianza de terneros. *FAVE Sección Ciencias Veterinarias*, 5(1/2), 69-80.
- Giraffa, G. (2002). *Enterococci from Foods*. *FEMS Microbiology Reviews* 26 pp. 163–171.
- Giraffa, G. (2003). Functionality of enterococci in dairy products. *International journal of food microbiology*, 88(2), 215-222.
- Hanchi, H., Hammami, R., Kourda, R., Hamida, J. B., & Fliss, I. (2014). Bacteriocinogenic properties and *in vitro* probiotic potential of enterococci from Tunisian dairy products. *Archives of microbiology*, 196(5), 331-344.
- Kimura M. (1980). A simple method for estimating evolutionary rate of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *Journal of Molecular Evolution* 16:131-120.
- Klein, G. (2003). Taxonomy, ecology and antibiotic resistance of enterococci from food and the gastro-intestinal tract. *International journal of food microbiology*, 88(2), 123-131.
- Kommineni, S., Bretl, D. J., Lam, V., Chakraborty, R., Hayward, M., Simpson, P. & Salzman, N. H. (2015). Bacteriocin production augments niche competition by enterococci in the mammalian gastrointestinal tract. *Nature*, 526(7575), 719-722.
- Lan, R., Koo, J., & Kim, I. (2017). Effects of *Lactobacillus acidophilus* supplementation on growth performance, nutrient digestibility, fecal microbial and noxious gas emission in weaning pigs. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 97(4), 1310-1315.
- Lara M, C., & Cardona D, J. (2013). Impacto de un biopreparado con características probióticas sobre la producción de leche bovina en Cór-

- doba-Colombia. *Biotecnología en el Sector Agropecuario y Agroindustrial*, 11(1), 75-80.
- Lara Mantilla, C., & Acosta Pineda, R. C. (2013). Bacterias celulolíticas aisladas del intestino de termitas (*Nasutitermes nigriceps*) con características probióticas y potencial en la degradación del pasto. *Revista Colombiana de Biotecnología*, 15(1).
- Lebreton, F., Willems, R. J., & Gilmore, M. S. (2014). *Enterococcus* diversity, origins in nature, and gut colonization.
- Leiva, S., Yañez, M., Zaror, L., Rodríguez, H & Garcíaquintana, H. (2004). Actividad antimicrobiana de Actinomycetales aislados desde ambientes acuáticos de sur de Chile. *Rev. Med. Chile*; 132; p.151-159.
- Liong, M. T.; Shah, N. P. 2005. Bile salt desconjugation ability, bile salt hydrolase activity and cholesterol co-precipitation ability of lactobacilli strains. *International Dairy Journal* 15,391-398
- Livney, Y. D. (2010). Milk proteins as vehicles for bioactives. *Current Opinion in Colloid & Interface Science*, 15(1), 73-83.
- Lombana, J., Martínez, D., Valverde, M., Rubio, J., Castrillón, J., & Marino, W. (2012). Caracterización del sector ganadero del Caribe colombiano. Barranquilla: Universidad del Norte. p 2-17
- Martínez-Barragán, I. K., González-Martínez, B. E., Campos-Góngora, E., de la Rosa, A. P. B., & Jiménez-Salas, Z. (2008). Identificación molecular de probióticos aislados de alimentos y suplementos: comparación con métodos bioquímicos. *Revista Salud Pública y Nutrición*, 9(4).
- McSweeney C, Mackie R. 2012. Microorganisms and ruminant digestion: State of knowledge, trends and future prospects. FAO, Background Study Paper # 61, 62 p. Disponible en: <http://www.fao.org/docrep/016/me992e/me992e.pdf>. Accesado: 9-03-2014.
- Mejía, J., Chacon, Z., Guerrero, B., Otoniel, J & Lopez, G. (2007). Obtención de cepas de *Lactobacillus*: caracterización in vitro como potenciales probióticas. *Revista científica*, abril, año/vol.xvll, #002. universidad de Zulia Maracaibo, Venezuela. 178-185. Nomoto, K. *Journal of Biological Sciencie Bioengineering*. 6 - 583.
- Ng, S. Y., Koon, S. S., Padam, B. S., & Chye, F. Y. (2015). Evaluation of probiotic potential of lactic acid bacteria isolated from traditional Ma-

- laysian fermented Bambang (Mangifera pajang). *Cyta-Journal of Food*, 13(4), 563-572.
- Pérez, M., Piad, R., Bocourt, R., Milian, G., Medina-Medina, E., Savon, L. & Laurencio, M. (2005). Actividad prebiótica y probiótica de un hidrolizado enzimático de crema de destilería en pollos de ceba. *Cyta-Journal of Food*, 5(1), 42-47.
- Pinzón, M. E. (1984). Historia de la ganadería bovina en Colombia. Suplemento Ganadero, Banco Ganadero. Bogotá (Col.), 4(1), 208.
- Prasad, J.; Gill, H.; Smart, J.; Gopal, P. K. 1998. Selection and characterization of *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* strains for use as probiotic. *International Dairy Journal* 8, 993-1002.
- Relling, A. E., & Mattioli, G. A. (2003). Fisiología digestiva y metabólica de los rumiantes. Fac. Ciencias Veterinarias. Argentina: Universidad Nacional de La Plata. p 9-25
- Rondón, A. J., Samaniego, L. M., Bocourt, R., Rodríguez, S., Milián, G., Ránilla, M. J. & Pérez, M. (2008). Aislamiento, identificación y caracterización parcial de las propiedades probióticas de cepas de *Lactobacillus* sp. *Cyta-Journal of Food*, 6(1), 56-63.
- Saelim, K., Sohsomboon, N., Kaewsuwan, S., & Maneerat, S. (2012). Probiotic properties of *Enterococcus faecium* CE5-1 producing a bacteriocin-like substance and its antagonistic effect against antibiotic-resistant enterococci *in vitro*. *Czech Journal of Animal Science*, 57(11), 529-539.
- Salvucci, E., Saavedra, L., Hebert, E. M., Haro, C., & Sesma, F. (2012). Enterocin CRL35 inhibits *Listeria monocytogenes* in a murine model. *Foodborne pathogens and disease*, 9(1), 68-74.
- Tajabadi, N., Mardan, M., Manap, M. Y. A., & Mustafa, S. (2013). Molecular identification of *Lactobacillus* spp. isolated from the honey comb of the honey bee (*Apis dorsata*) by 16S rRNA gene sequencing. *Journal of Apicultural Research*, 52(5), 235-241.
- Tamime, A. Y. (2002). Fermented milks: a historical food with modern applications--a review. *European Journal of Clinical Nutrition*, 56(n4s), S2.

- Tamura K., Stecher G., Peterson D., Filipski A., and Kumar S. (2013). MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0. *Molecular Biology and Evolution* 30: 2725-2729.
- Tiantong, A., Piamya, P., Chen, S. E., Liu, W. B., Chang, F. Y., Lin, P. C. & Chang, C. J. (2015). Systemic and local bactericidal potentiality in late lactation Holstein-Friesian cows following a combined antibiotics and *Enterococcus faecium* SF68 dry-cow treatment. *Japanese Journal of Veterinary Research*, 63(3), 139-150.
- Van Lier & Regueiro, 2008. Digestión en retículo-rumen. Curso de anatomía y fisiología animal. Facultad de agronomía universidad de la república. Montevideo, Uruguay. Pág. 8. Recuperado de <http://prodanimal.fagro.edu.uy/cursos/AFA/TEORICOS/Repartido-Digestion-en-Reticulo-Rumen.pdf>.
- Vargas, E. M., Gómez, C. J., Parra, M. E., & Romero, M. A. (2004). Producción de microorganismos probióticos como Aditivo para alimentos concentrados para ganado Vacuno. *Revista de Ingeniería*, (19), 167-178.
- Vimont, A., Fernandez, B., Hammami, R., Ababsa, A., Daba, H., & Fliss, I. (2017). Bacteriocin-producing *Enterococcus faecium* LCW 44: a high potential probiotic candidate from raw camel milk. *Frontiers in microbiology*, 8.
- Walter, J., & Ley, R. (2011). The human gut microbiome: ecology and recent evolutionary changes. *Annual review of microbiology*, 65, 411-429.
- Yimin, C., Benno, Y., Nakase, T., & Oh, T. K. (1998). Specific probiotic characterization of *Weissella hellenica* DS-12 isolated from flounder intestine. *The Journal of general and applied microbiology*, 44(5), 311-316.

CAPÍTULO 8

CARACTERÍSTICAS PROBIÓTICAS DE LEVADURAS NATIVAS AISLADAS DE VACAS LECHERAS DE RAZA GYR EN EL DEPARTAMENTO DE SUCRE

Karen María De Hoyos Correa ²⁰

Jhoan Alonso Cardona Doria ²¹

Luty del Carmen Gomezcaceres Pérez ²²

20 Biólogo. Maestría en Biotecnología

21 Biólogo. Maestría en Biotecnología

22 Bacterióloga, Especialista en aseguramiento de la calidad Microbiológica. Maestría en Agricultura del Trópico Húmedo. Estudiante de Doctorado. Profesora en Corporación Universitaria del Caribe - CECAR

Introducción

Colombia es un país en el que la ganadería bovina es la principal actividad agropecuaria, destacándose que el ganado doble propósito es la especialidad que concentra el mayor porcentaje a nivel nacional con un 38,8%, mientras que un 35% se dedica a la cría, el 19,8 % a la ceba y el 6,4 % a lechería especializada, lo que conlleva a que se ocupe el doceavo lugar en el ranking de producción mundial, y el quinto lugar a nivel latinoamericano (Martínez, 2009).

La Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO), recomienda un consumo anual de 188 litros de leche por persona, y 33 kg de carne magra, sin embargo, a nivel nacional los datos promedio reportados son de 44 litros de leche y de 10 kg de carne anual por habitante (Martínez, 2009). La problemática en el sector ganadero del país se acentúa en razón a que Colombia es uno de los países con medicamentos animales más caros del mundo, asimismo, la presencia de residuos de antibióticos en la leche aqueja a toda la industria lechera, debido a que cantidades mínimas de antibióticos en la leche o la carne representan un problema de salud pública que no debe ser aceptado, además de ser ilegal (Gómez, 2013). Sumado a ello, se presenta el problema de la resistencia de los microorganismos a los antibióticos, llegando a reducir o eliminar por completo su acción y uso en el tratamiento de enfermedades (Díaz, 2013). El principal factor incidente es la aparición de cepas resistentes en el empleo excesivo de antimicrobianos, con tres propósitos básicos: profilaxis, tratamiento terapéutico y promoción del crecimiento (FAO, 2005).

Los antibióticos y otros antimicrobianos se utilizan ampliamente en los tratamientos de la mastitis y otras enfermedades infecciosas como neumonía, podofilitis, etc. Hoy en día, se utilizan en el tratamiento profiláctico de vacas no lactantes y en este caso, pueden ser excretados elevados niveles de residuos durante largos periodos después del parto. Adicionalmente, los antibióticos presentes en la leche pueden inducir

alteración de la flora intestinal, desarrollo de microorganismos patógenos y reducción de la síntesis de vitaminas; sin embargo, a interior del tubo digestivo de animales (y el hombre) existen microorganismos que favorecen la asimilación de alimentos, debido a que presentan propiedades que pueden ser aprovechadas, no solo a nivel de la misma agricultura, sino que también pueden tener aplicaciones médicas, esos microorganismos son llamados probióticos (OMS, 2004). Los probióticos han sido señalados como una alternativa al uso de antibióticos promotores de crecimiento en la alimentación animal. Asimismo, estimulan la digestión y ayudan a mantener el equilibrio microbial en el intestino de los animales, acciones que contrarrestan el estrés derivado de los cambios en las dietas, las condiciones perjudiciales de manejo, y el ataque de patógenos (Anderson et al., 1999).

Una de las ventajas de los probióticos es el control de las infecciones intestinales en el ganado, dado que el uso de antibióticos a pesar de ser efectivo en algunos tratamientos ha provocado problemas como la afectación de la microbiota intestinal, predisposición a infecciones y aumento de cepas resistentes. Ante esta situación los probióticos constituyen una alternativa para evitar enfermedades y desordenes intestinales (Avila, 2010).

En el departamento de Sucre, la ganadería ocupa un lugar muy importante en la economía, en el año 2014 las fincas ganaderas ascendían a 17.296 predios, con una población bovina aproximada de 823.131 cabezas de ganado (Censo Nacional Agropecuario, 2014), y el sector lácteo es uno de los renglones básicos, con un aporte lechero en el mercado nacional de 634.863 litros diarios aproximadamente, disponibles especialmente para las plantas procesadoras y centros de acopio, representando el 3,3% de la producción de leche diaria a nivel nacional (Dimas, 2016). Sin embargo, la producción de leche en Sucre ha bajado entre un 40 % y 50 % por la sequía y afecciones gástricas (Aguilera, 2005)

Uno de los probióticos más utilizados en alimentación animal, tanto en monogástricos como en rumiantes; son las bacterias de los géneros *Lactobacillus* y *Bifidobacterium*, aunque algunas formulaciones pueden incluir algunas cepas de *Streptococcus*, *Enterococcus*, *Pediococcus*, *Propionibacterium*, *Bacillus* y *Escherichia* (Rodríguez, 2015). Adicionalmente, cultivos de levaduras y mohos se utilizan como aditivos comerciales para mejorar la fermentación ruminal. Estos se designan

“Direct Feed Microbes” o “alimentación directa con microorganismos” y se les asocia con capacidad fibrolítica o degradativa de paredes celulares; siendo *Saccharomyces cerevisiae* y *Aspergillus niger* los más utilizados para este propósito (Caja et al., 2003).

Existe un relativo consenso de que las mejores respuestas en rumiantes se han observado en casos de vacas lecheras, y los efectos reconocidos en rumiantes se atribuyen al aumento de la celulólisis ruminal y del flujo de proteína microbiana al intestino (Van Vuuren, 2003). Actualmente, la raza Gyr y el cruce con esta raza, se ha convertido en una alternativa para mejorar la productividad lechera de los hatos del departamento, debido a su aptitud para la producción de leche y adaptación al trópico. A pesar de la vocación ganadera de Sucre, es muy poco lo que se conoce y se ha reportado acerca del potencial que puede representar el ganado, por ello es importante desarrollar estudios que evalúen las características probióticas de levaduras nativas aisladas a partir de estiércol de vacas lecheras de raza Gyr en el departamento de Sucre.

Identificar los microorganismos con características probióticas en vacas lecheras de raza Gyr en el departamento de Sucre, permitirá conocer el potencial uso de estos microorganismos, según los resultados que se obtengan, lo que contribuirá significativamente a la comunidad científica interesada, dado que al respecto es nueva información para el sector ganadero del departamento.

Caracterización de las propiedades probióticas in-vitro de levaduras aisladas a partir de muestras de estiércol de vacas lecheras de raza gyr.

Caracterización de las levaduras aisladas.

En el departamento de Sucre solo 6 haciendas poseen ganado de raza Gyr puro, de las cuales se muestreó un 66,7%, correspondiente a 4 haciendas ubicadas en los municipios de Sampués, Toluviejo, Corozal y Sincé. La muestra de heces fue tomada del recto del animal e inmediatamente se depositó en un recipiente estéril con una capa de aceite mineral para mantener en condiciones de anaerobiosis. En total se colectaron 4 muestras posteriormente fueron trasladadas en cavas con hielo hasta el laboratorio de biotecnología de la universidad de Córdoba para su procesamiento.

A partir de un pool de heces de 12 vacas raza Gyr sanas (3 de cada hacienda), de 53 a 96 meses de edad, alimentadas a base de maíz, pasto, vegetales y sin antibióticos, se aislaron 9 cepas de levaduras que crecieron tras diluciones y purificación en medio SDA (Rondón et al., 2008), las cuales fueron caracterizadas morfológicamente. En la tabla 1 se muestran las principales características morfológicas de las cepas aisladas.

Tabla 1. Características morfológicas de las levaduras nativas aisladas de las muestras de heces de vacas lecheras raza Gyr en el departamento de Sucre.

MEDIO DE CULTIVO	CEPAS (Código)	CARACTERISTICAS MACROSCOPICAS	CARACTERISTICAS MICROSCOPICAS	TINCIÓN CON AZUL DE LACTOFENOL
		Morfología	Gram	
Sabouraud Dextrosa Agar (SDA)	KSPS 5B	Colonias grandes, color blanco, borde irregular	Positivo	Ausencia de pseudohifas y clamidosporas
	KSPS 3A	Colonias medianas, circulares, color crema, con bordes enteros	Positivo	Ausencia de pseudohifas y clamidosporas
	KSPS 3'A		Positivo	Presencia de pseudohifas
	KSPS 4A	Colonias grandes, circulares, elevadas, borde entero	Positivo	Doble pared, presencia de clamidosporas, ausencia de pseudohifas
	KSPM 6'A		Positivo	Presencia de pseudohifas
	KSPS 5'A		Positivo	Presencia de Clamidosporas y pseudohifas
	KISDA 4A		Positivo	Ausencia de pseudohifas y clamidosporas
	KSPM 6A	Colonias medianas, circulares, color blanco, borde entero	Positivo	
	KSPM 6'B	Colonias grandes, color blanco, borde irregular	Positivo	Presencia de Clamidosporas y pseudohifas

Fuente: Cálculos del estudio

Dentro de los microorganismos aislados, las levaduras una vez crecidas en medio SDA fueron sembradas en Chromagar en donde 8 de las 9 cepas mostraron un crecimiento de color verde, y azul, lo que indica que poseen características del género *Cándida*, descartando la continuidad de estas en el proceso de selección de microorganismos con características probióticas. La cepa KSPS 3'A mostró un crecimiento de color amarillo cremoso por lo que esta cepa se seleccionó para la realización de pruebas probióticas.

Características probióticas de los aislados

Tolerancia a cambios de pH. La cepa KSPS 3'A se evaluó a diferentes valores de pH, 3, 4, 5.6 y 7 (incubación a 37 °C durante 24 hrs); la sobre-vivencia y resistencia se comprobó al comparar el conteo de microorganismos viables del inóculo, con las células sobrevivientes después de la incubación (Zavaglia et al., 1998); el porcentaje de resistencia se calculó con la fórmula de (Kociubinski et al., 1999): $\% R \text{ pH} = [(UFC/\text{mL}) \text{ MRS pH} \times 100] / (UFC/\text{mL}) \text{ MRS (inóculo)}$, estableciéndose como criterio de selección resistir a un pH por encima del 50 %.

Al observar el comportamiento de la cepa de levadura sometida a diferentes concentraciones de pH se evidenció que KSPS3'A (*Kluyveromyces marxianus*/*Candida kefyr*) mostró crecimiento en todas las concentraciones de pH como se evidencia en la Figura 1.

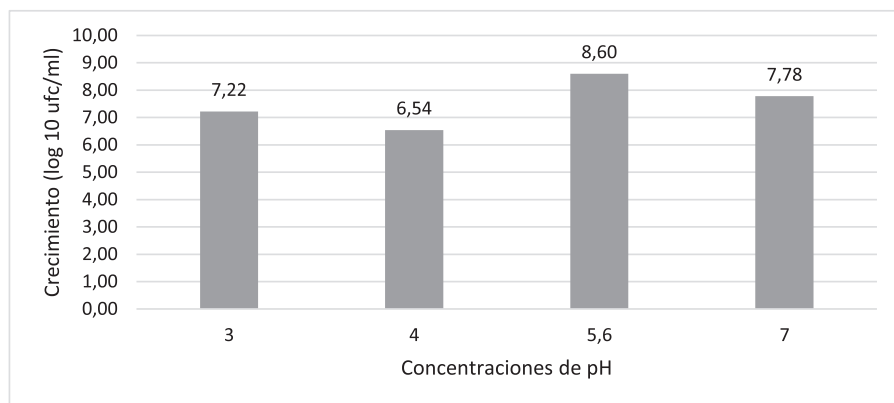


Figura 1. Crecimiento (log 10 ufc/ml) de la cepa KSPS3'A frente a diferentes concentraciones de pH (3, 4, 5,6 y 7).

Esto concuerda con lo reportado por You et al., (2006) quienes, en la búsqueda de microorganismos probióticos en los alimentos, aislaron una cepa de *Candida kefir* de granos de kefir y la sometieron a condiciones de simulación del tracto gastrointestinal. Esta levadura mostró altas resistencias al ambiente ácido y no murió incluso a pH 2,0, resultado que le confiere una ventaja y la convierte en una posible opción probiótica. Asimismo, Maccaferri et al., (2012) investigó diversos rasgos probióticos potenciales de *K. marxianus* utilizando ensayos in vitro, encontrando que esta levadura sobrevivió en condiciones de simulación gástrica a pH 2 con un valor final de $4,97 \log \text{cfu/mL}$. Estos resultados también concuerdan con los obtenidos por Mendoza., (2013) quien evaluó la capacidad probiótica de la levadura *K. marxianus*, aislada a partir de una muestra de pulque y para ello fue sometida a valores de pH entre 1.5 a 4 por hasta 24 horas, siendo capaz de sobrevivir a estas condiciones.

Esta resistencia a cambios de pH se debe posiblemente a que existen sistemas intracitoplásmicos que permiten regular su equilibrio ácido base tal como sucede con otras levaduras lo cual hace que puedan soportar variaciones de pH, particularmente la acidez tal como lo menciona Fujimori et al., (2007), quien señala que la tolerancia de las levaduras a diferentes valores de pH se debe a los antiportadores de la bomba de Na^+/H^+ que poseen las levaduras, estos son proteínas encontradas en la membrana citoplasmática así como en los organelos de las células, estas proteínas catalizan el intercambio de cationes monovalentes (Na^+ o K^+) y H^+ a través de las membranas, de tal modo que regulan las concentraciones de cationes y pH a nivel citoplasmático y de los organelos (Mitsui et al., 2005; Ohgaki et al., 2005).

Viegas et al., (1998) sugieren que existe otro mecanismo adicional de las levaduras para regular el pH y la concentraciones, se trata de una ATPasa, codificada por el gen PMA 1 que se localiza en la membrana citoplasmática, esta puede crear un gradiente electroquímico de protones que conduce al transporte secundario de solutos que está implicado en mantenimiento del pH cercano a la neutralidad y que además de ser un componente crítico de la adaptación de la levadura a los ácidos., es útil para muchas de las funciones fisiológicas de la levadura como la toma de nutrientes y la regulación intracelular.

Tolerancia a sales biliares. El ensayo se realizó con diferentes concentraciones de sales 0,05, 0,1, 0,15 y 0,3 % p/v ajustado el pH =7, e incubación a 37 °C durante 24 h, la sobrevivencia y resistencia se comprobó mediante la determinación del número de células viables (UFC) (Brizuela, 2003; Rubio et al., 2008, Rondón et al., 2008; Avila et al., 2010). Como resultado del comportamiento respecto a la tolerancia que exhiben los microorganismos a las diferentes concentraciones de sales biliares se pudo evidenciar que la cepa KSPS3'A (*Kluyveromyces marxianus*/ *Candida kefyr*) también presentó crecimiento en todas las concentraciones de sales biliares como se observa en la Figura 2.

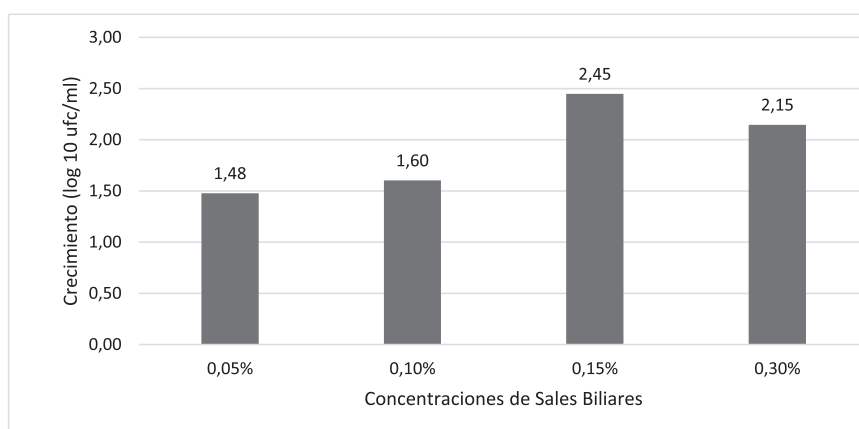


Figura 2. Crecimiento (log 10 ufc/ml) de la cepa KSPS3'A frente a diferentes concentraciones de sales biliares (0,05%; 0,10%; 0,15%; y 0.3%).

Este comportamiento es similar al señalado por You et al., (2006) en una de sus investigaciones donde *K. marxianus* muestra una alta tolerancia a la sal biliar al 1,0%, con un porcentaje de supervivencia de 97,2% luego de ser sometida a una simulación del tracto gastrointestinal. De igual forma Mendoza et al., (2013) con la finalidad de comprobar la resistencia de la levadura a las sales biliares, realizaron un ensayo exponiendo a *K. marxianus* a diferentes concentraciones de sales biliares, mostrando ser resistente a concentraciones de 0.05% a 0.30%, y se observó que la cantidad de ufc/ml de las levaduras en todos los casos se mantiene en el orden de 1×10^6 , indicando su tolerancia las diferentes concentraciones evaluadas. .

Estudios similares propuestos por Gilliland (2004) y Kühle (2005) reportaron que cepas de levaduras como *S. cerevisiae* y *S. var. bouldarii* mostraron resistencia a concentraciones de sales biliares de 0.30% (p/v) observando que dichas cepas crecían incluso después de 4 horas de incubación, para el estudio de *K. marxianus* el mayor periodo de incubación fue de 24 horas lo cual representa una ventaja al ser un periodo de tiempo mucho más grande.

Tolerancia a cloruro de sodio (NaCl). Se realizó una evaluación de KSPS3'A (*Kluyveromyces marxianus*/ *Candida kefir*), a diferentes concentraciones de NaCl, 2, 4, 7 y 10 % p/v, e incubación a 37 °C durante 24 h; (Rondón et al., 2008), ésta cepa mostró crecimiento en todas las concentraciones, disminuyendo la densidad óptica a medida que la concentración de NaCl aumentaba como se observa en la Figura 3.

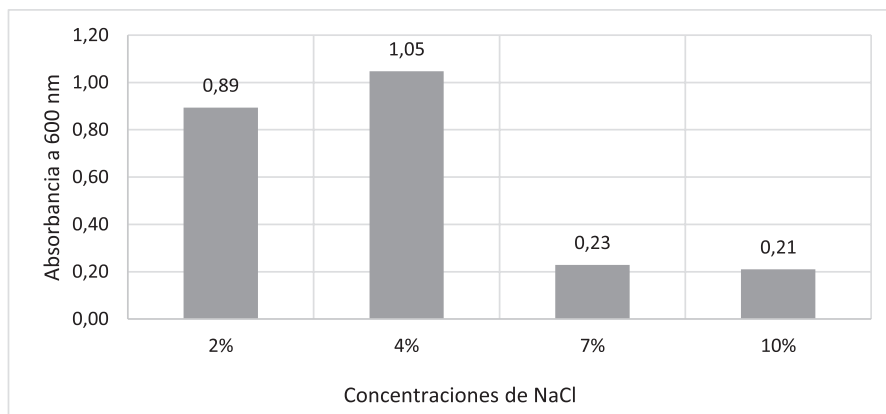


Figura 3. Promedios de crecimiento (Absorbancia 600 nm) de la cepa KSPS3'A frente a las diferentes concentraciones de NaCl (2%; 4%; 7%; y 10%).

Resultados similares reportaron Cardona., (2014), Díaz., (2013) y Pacheco (2013) en sus respectivas investigaciones donde a medida que se incrementaba la concentración de Cloruro de Sodio, disminuía el crecimiento de las levaduras evaluadas.

Prueba de antagonismo. La capacidad inhibitoria de KSPS3' fue evaluada contra *Salmonella* sp, *Pseudomona* y *E. coli*, sembradas en forma masiva en agar Müller Hinton. Observando que KSPS3'A (*Kluyveromyces marxianus*/ *Candida kefir*) presentó halo de inhibición frente a *Salmonella*

(0,95 mm) y *E.coli* (0,98 mm), pero no frente a *Pseudomona* sp. Como se observa en la Figura 4.

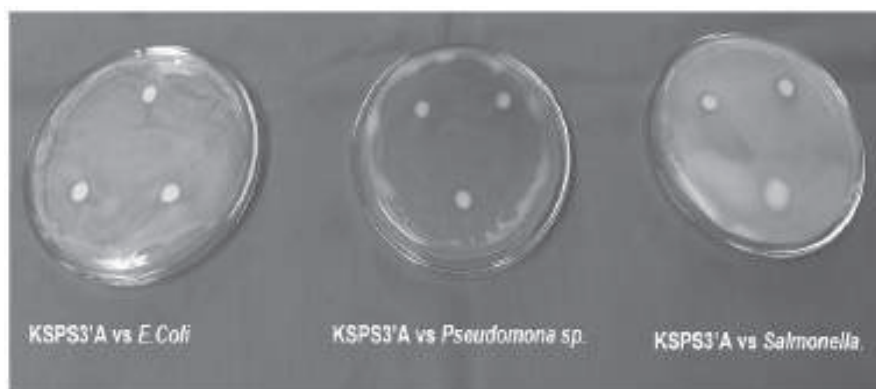


Figura 4. Promedios de crecimiento (Absorbancia 600 nm) de la cepa KSPS3'A frente a las diferentes concentraciones de NaCl (2%; 4%; 7%; y 10%).

You et al., (2006) reportaron que *Candida kefyr* no fue inhibida por el antibiótico tetraciclina. Estos resultados sugieren que esta levadura posee propiedades útiles como probióticos. Otras investigaciones señalan que *K. marxianus* inhibió el crecimiento de *Klebsiella pneumoniae* en ensayo in vitro, cabe mencionar que en algunas ocasiones la inhibición del crecimiento de un microorganismo patógeno puede darse no solo por la producción de sustancias antimicrobianas, sino por la competencia en la superficie de adhesión en el intestino, o por la competencia por nutrientes (Mendoza., 2013)

Existen levaduras como *Saccharomyces boulardii*, que son capaces de inhibir el crecimiento de microorganismos patógenos pertenecientes a las cepas de *Clostridium difficile*, *Vibrio cholerae*, *Escherichia coli*, y algunas otras bacterias enteropatógenas (Elmer y Corthier., 1991). Asimismo, Rodríguez et al., (1996) reporta que la levadura *Saccharomyces boulardii* es capaz de inhibir la multiplicación de *Salmonella typhimurium* y *Shigella flexneri*, y *Klebsiella pneumoniae* en estudios in vitro.

Otro factor importante del cual depende la inhibición de un microorganismo patógeno es de la cantidad del inóculo. Al analizar la inhibición de *Staphylococcus aureus* por *Lactobacillus casei* y *L. acidophilus*, Salvatierra et al., (2004) reportó que el efecto depende de la concentración del inóculo y del tipo de patógeno lo que sugiere que

el efecto inhibitorio del microorganismo probiótico depende tanto de la especie de microorganismo patógeno y su concentración, así como de la concentración del microorganismo inhibidor, Rodríguez et al., (1996).

Prueba de fermentación de la glucosa. Se utilizó caldo MRS que contenían 0,2 % v/v de una solución de púrpura de bro-mocresol (0,5 %) y campanas de Durham; la producción de gas se evidenció mediante la presencia de gas en las campanas y luego de incubación a 37 °C durante 48 hrs (Rubio et al., 2008, Rondón et al., 2008). *K. marxianus* presentó producción de gas (Ver Figura 5), lo que sugiere que la glucosa se fermento. Esta levadura puede ser de mucha importancia para metabolizar el oxígeno residual que entra con los alimentos manteniendo una anaerobiosis en el rumen. Díaz, (2013) reportó que levaduras aisladas de cerdo zungo costeño, producen gas (CO₂) y Pacheco, (2013), reportó datos similares al evaluar la producción de gas por levaduras aisladas de heces de gallinas ponedoras; lo que en monogástricos no es favorable por que puede producir trastornos digestivos; pero en rumiantes, hay una serie de mecanismos por los cuales se aprovecha el CO₂ producto de la fermentación ruminal. Como el metabolismo microbiano es anaerobio; y por lo tanto, no existe una cadena respiratoria que acepte estos hidrogeniones, los microorganismos los transfieren a distintos aceptores o sumideros de hidrógeno; Uno de los más importantes es el carbono (CO₂), originando la formación de metano (CH₄) (Relling y Mattioli 2003).

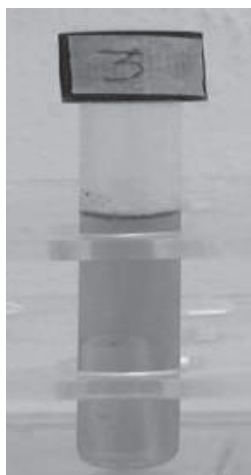


Figura 5. Capacidad de fermentación de glucosa de la cepa de levadura KSPS3'A

Tolerancia a cambios de temperatura. KSPS3' (*K. marxianus*) fue soemtida a temperaturas de 30 y 40°C por un periodo de 24h (Rubio et al., 2008, Rondón et al., 2008; Ávila et al., 2010). *K. marxianus* presentó un crecimiento satisfactorio en ambas temperaturas, siendo 40°C donde obtuvo valores más altos como se muestra en la Figura 6.

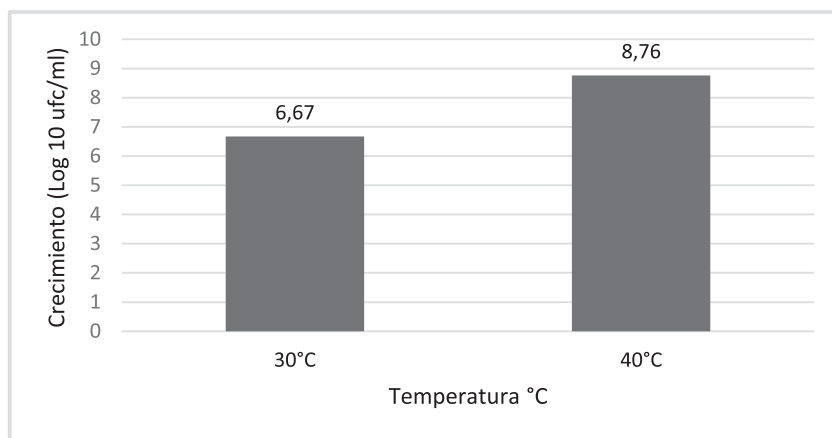


Figura 6. . Crecimiento (Log 10 ufc/ml) de la cepa de levadura KSPS3'A a 30°C y a 40°C.

Existen muchas investigaciones que han seleccionado como objeto de estudio a *K. marxianus*, y en ellas se observa como esta levadura ha tenido un extenso rango de temperatura de crecimiento.

Gouch et al., (1996) afirmaban que *Kluyveromyces marxianus* tenía una temperatura de crecimiento optimo que oscilaba entre 20 y 30°C. Diestra et al., (2015) señaló que la temperatura de crecimiento de este microorganismo es 39°C, y You et al., (2006) señalaron que *Candida kefir* mostró una alta estabilidad térmica y de reproducción a 60 ° C.

Por su parte Mendoza, (2013) muestra que el rango de temperatura para *K. marxianus* oscila entre 27°C y 43°C ubicándola en la categoría de termo resistente a diferencia de otras levaduras que son más sensibles a la temperatura. Una muestra de ello, la sustenta Kumura., (2004) quien señala que *Saccharomyces* sp tiene una temperatura optima de crecimiento a 37°C, y Salazar et al., (2016) quienes reportan que *Lactobacillus curvatus* en compañía de las levaduras *Candida famata*, *Can. magnoliae*, *Can.*

krusei/incospicua y *Can. sphaerica* tuvieron una temperatura óptima de crecimiento a 33,5 °C.

Prueba de crecimiento.

La cepa de levadura que resistió la presencia de sales biliares y acidez se cultivó en 30 ml de caldo de guayaba agria, y se incubó a 37 °C durante 24 y 48 hrs; se realizó una curva de crecimiento para ver su comportamiento en el tiempo con los siguientes horarios de incubación (0, 6, 12, 18, 24 y 30 horas) (Rondón et al., 2008), encontrandose que cepa KSPS3'A (*K. marxianus*) mostró un crecimiento exponencial ya que se va incrementando a medida que aumenta el tiempo Figura 7.

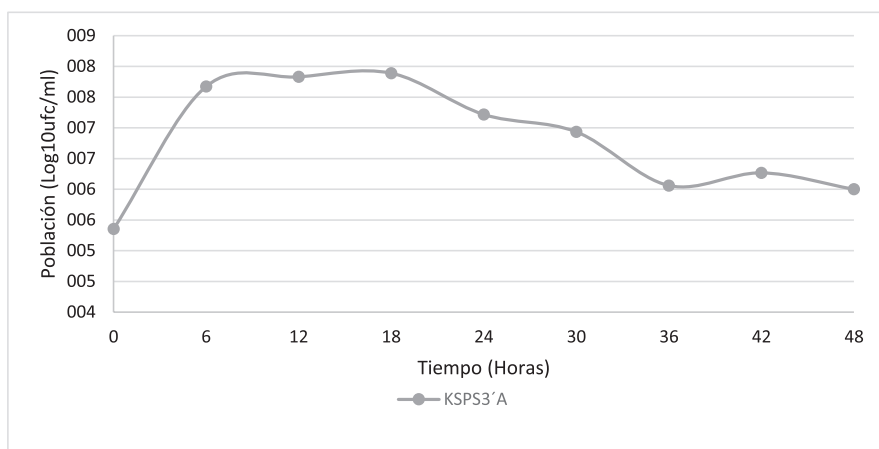


Figura 7. Crecimiento (Log 10 ufc/ml) de la cepa de levadura KSPS3'A a 30°C y a 40°C.

Adicionalmente se observó que su fase estacionaria se encuentra entre las 16 y 22 horas, finalmente la fase de muerte después de las 23 horas. Estos resultados difieren de los reportados por Mendoza, (2013) quien señaló que la fase logarítmica de *K. marxianus* inicia a la hora 3, su fase estacionaria es de las 27 a las 36 horas y la fase de muerte después de las 39 horas.

Es necesario resaltar que para la cepa KSPS3'A en su fase estacionaria existen poblaciones de 7,8x10⁷ UFC/ml, cantidades óptimas de microorganismos para la preparación de un inoculo a partir del cual se pueda elaborar un producto nutricional como alternativa para ofertar a la

comunidad una visión de producción, reducción de las patologías entéricas de origen bacteriano, y reducción de costos para el propietario al disminuir la frecuencia de patologías digestivas en el ganado. Esto concuerda con los resultados reportados por Cavazzoni., (1998) quien señala que el número de microorganismos que debe contener un preparado comercial probiótico debe ser de 106 – 108 ufc/mL, para que al llegar a las células blanco puedan actuar sobre el huésped.

Identificación a nivel molecular las levaduras con potencial probiótico probadas in-vitro.

Teniendo en cuenta que la cepa KSPS3'A obtuvo buenos resultados en las pruebas probióticas "in-vitro", se seleccionó para ser identificada mediante biología molecular. Para ello se aisló y purificó su DNA, con el fin de posteriormente amplificar por PCR de la región genética que codifica para la subunidad 16s del RNA ribosomal de procariotes. Una vez hecho esto, se purificó el fragmento de PCR amplificado, acto seguido se secuenció por extensión del iniciador del fragmento de 1465 pares de bases con cuatro diferentes iniciadores y se realizó un análisis bioinformático comparativo con bases de datos de secuencias de DNA de levaduras para el alineamiento y generación de un árbol de distancias utilizando las secuencias con mayor similitud a la secuencia problema y por último se realizó la clasificación taxonómica de la secuencia consenso.

Con respecto a la cepa de levadura KSPS3'A, los resultados del análisis taxonómico de esta secuencia de 708 pb contra la base de datos nr/nt del NCBI, indicaron que la secuencia problema tiene un 100% de identidad en el 100% de su longitud con secuencias de ITS pertenecientes a las especies *Kluyveromyces marxianus*. Este mismo análisis fue realizado contra la base de datos UNITE y RDP (Warcup Fungal ITS) especializadas en secuencias de hongos y el análisis indica que la secuencia tiene mayor similitud con secuencias de *Kluyveromyces marxianus* (Figuras 8 y 9).

Características probióticas de levaduras nativas aisladas de vacas lecheras de raza gyr en el departamento de Sucre

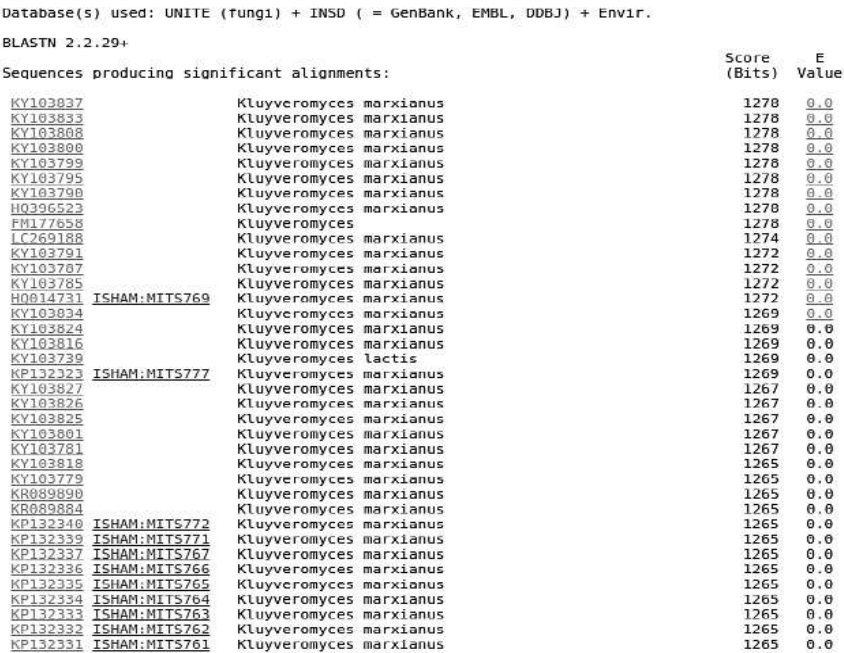


Figura 8. Resultado de la comparación de la secuencia KSPS3'A contra la base de datos UNITE.

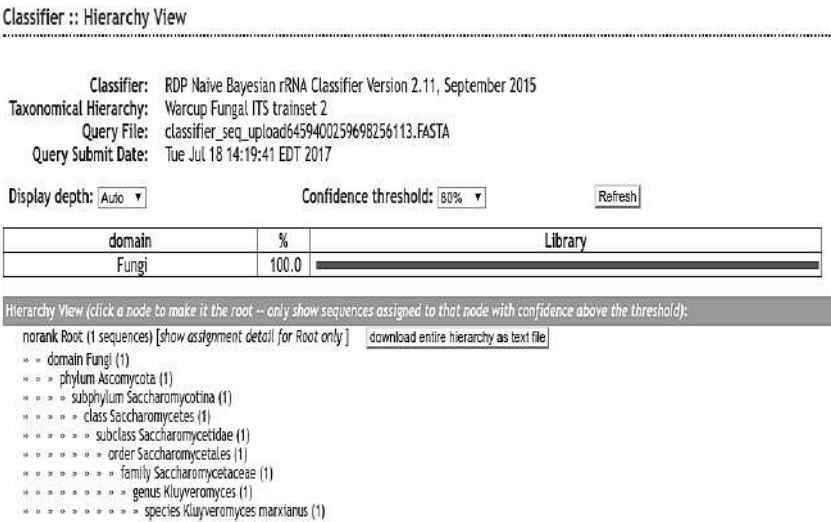


Figura 9. Resultado de la comparación de la secuencia de KSPS3'A contra la base de datos Warcup fungal RDP

Adicionalmente, se cotejó contra la base de datos especializada en levaduras YiestID indicando que la secuencia tiene una mayor similitud con *Kluyveromyces marxianus* (Figura 10).

Sequences producing significant alignments:			Score (bits)	E Value
a199	T	<i>Kluyveromyces marxianus</i> NRRL Y-8281, CBS 712 ITS	1255	0.0
a198	T	<i>Kluyveromyces dobzhanskii</i> CBS 2104 ITS	1053	0.0
a5282	N	<i>Kluyveromyces lactis</i> CLIB 210 ITS	1007	0.0
a200	NT	<i>Kluyveromyces lactis</i> CBS 683 ITS	1007	0.0
a201	T	<i>Kluyveromyces wickerhamii</i> CBS 2745 ITS	892	0.0
a203	T	<i>Kluyveromyces aestuarii</i> CBS 4438 ITS	670	0.0
a202	T	<i>Kluyveromyces nonfermentans</i> CBS 8778 ITS	666	0.0
a208	T	<i>Lachancea cidri</i> CBS 4575 ITS	365	e-101
a207	T	<i>Lachancea fermentati</i> CBS 707 ITS	365	e-101
a5251	IT	<i>Candida ascalaphidarum</i> ATCC MYA-4358, CBS 1015...	351	7e-97
a5666	T	<i>Wickerhamomyces ciferrii</i> CBS 111 ITS	349	3e-96
a205	T	<i>Lachancea waltii</i> CBS 6430 ITS	347	1e-95
a4746	T	<i>Yamadazyma terventina</i> CBS 12510 ITS	343	2e-94
a4194	T	<i>Candida dendronema</i> CBS 6270 ITS	343	2e-94
a4188	T	<i>Candida germanica</i> CBS 4105 ITS	343	2e-94
a4527	T	<i>Wickerhamomyces edaphicus</i> CBS 10408 ITS	341	6e-94
a5722	T	<i>Wickerhamomyces subpelliculosa</i> CBS 5767 ITS	341	6e-94
a3394	T	<i>Schwanniomyces vanrijiae</i> CBS 6246 ITS	341	6e-94
a4341	T	<i>Candida chilensis</i> CBS 5719 ITS	341	6e-94
a5702	T	<i>Candida silvicultrix</i> CBS 6269 ITS	341	6e-94
a4759	T	<i>Lachancea lanzarotensis</i> CBS 12615 ITS	339	3e-93

Figura 10. Resultado de la comparación de la secuencia de KSPS3'A contra la base de datos YiestID

Al realizar una comparación de la secuencia de KSPS3'A contra la base de datos del GenBank el análisis arrojó que la especie *Kluyveromyces marxianus* presentó un 100% de identidad con la secuencia de dicha cepa, corroborando el resultado de identificación de la cepa analizada.

Kluyveromyces marxianus es una levadura perteneciente a la familia Saccharomycetaceae, es la forma sexual o teleomorfa de *Candida kefir*, termotolerante, y exhibe una alta tasa de crecimiento a 40°C (Seyis y aksoz., 2004). Las colonias de *K. marxianus* son de color crema a dorada y con la pigmentación rosada ocasionada debido a la producción del pigmento de quelato de hierro (Kurtzman et al., 2011).

Los biofilms de esta levadura son a menudo resistentes a los agentes antifúngicos comúnmente utilizados, debido a la dificultad en la penetración de la matriz polimérica extracelular (Nerurkar et al., 2012). Dentro de las

características de este microorganismo se puede encontrar que crece en una gran variedad de sustratos y a altas temperaturas que oscilan entre 20° C hasta 39°C, con un pH óptimo entre 6 y 7 (Fonseca et al., 2008).

El uso industrial de *K. marxianus* es principalmente en la conversión de lactosa en etanol como precursor para la producción de biocombustible (Lane et al., 2011) la capacidad de *K. marxianus* para reducir la lactosa es útil debido a la posibilidad de transformar residuos industriales de suero de leche, un producto problemático de desecho para su eliminación, en biomasa útil para piensos, aditivos alimentarios o combustible (Lane et al., 2011). Ciertas cepas también se pueden utilizar para convertir el suero en acetato de etilo, una fuente de combustible alternativo. (Looser et al., 2015). *K. marxianus* también se utiliza para producir las enzimas industriales: inulinase, β -galactosidasa y pectinasa. Looser et al., (2015) dice que debido a la tolerancia al calor de *K. marxianus*, son posibles altas fermentaciones térmicas, lo que reduce los costos normalmente gastados para el enfriamiento, así como el potencial de contaminación por hongos o bacterias. Además, las fermentaciones a temperaturas más altas ocurren más rápidamente, haciendo la producción mucho más eficiente (Yang et al., 2015).

Debido a la capacidad de *K. marxianus* de utilizar simultáneamente lactosa y glucosa, su prevalencia en los entornos industriales es alta, ya que disminuye el tiempo de producción y aumenta la productividad (Fonseca et al., 2013). Recientes esfuerzos han intentado utilizar *K. marxianus* en la producción de aromas alimentarios a partir de productos de desecho de tomate y pimiento como sustrato (Güneşer et al., 2015). Maccaferri et al., (2012) desarrolló una investigación en la cual evaluaron las propiedades probióticas de *Kluyveromyces marxianus* B0399 utilizando ensayos in vitro, incluyendo la adhesión y la modulación inmune, y el efecto de la administración de 107 UFC / día de *K. marxianus* B0399 sobre la composición y la actividad metabólica de la microbiota intestinal humana, todo esto en un sistema de cultivo continuo de 3 etapas que simulaba el colon humano. Los resultados de esta investigación demostraron que esta cepa fue muy adhesiva a las células Caco-2 similares a enterocitos humanos y moduló la respuesta inmune, induciendo citocinas proinflamatorias en células mononucleares de sangre periférica (PBMCs). En presencia de estimulación inflamatoria con lipopolisacárido (LPS), *K. marxianus*

B0399 provocó disminuciones en los niveles de producción de citocinas proinflamatorias en PBMCs y células Caco-2, mejorando así la respuesta inflamatoria. Además, afectó a la microbiota del colon, aumentando la concentración de bifidobacterianos en las etapas del sistema del modelo colónico que simula el colon proximal y transversal. Las cantidades de acetato de ácidos grasos de cadena corta y propionato también aumentaron después de la suplementación con levadura. Finalmente, se encontró que *K. marxianus* B0399 induce una disminución del potencial citotóxico del sobrenadante de cultivo de la primera etapa del sistema de modelo de colon. Los efectos de *K. marxianus* B0399 sobre la adhesión, la función inmune y la microbiota colónica demuestran que esta cepa posee una serie de propiedades beneficiosas y específicas de cepa deseables para un microorganismo considerado para su aplicación como probiótico.

Por su parte Ceugniez et al., (2017) aislaron recientemente *Kluyveromyces marxianus* S-2-05 y *Kluyveromyces lactis* S-3-05 de un queso francés tradicional, Tomme d'Orchies, y caracterizaron las ventajas de aplicación de estas cepas sobre el queso. Obteniendo como resultado su actividad anti-Salmonella principalmente en presencia de *K. marxianus* S-2-05. Además de su antagonismo, estas levaduras fueron capaces de sobrevivir en condiciones que imitan el medio gastrointestinal para formar biofilms en un dispositivo abiótico tal como poliestireno, dejando ver que las superficies de las paredes de las células poseen propiedades hidrófilas y capacidad de adhesión a las células Caco-2 intestinal, aumentando así su potencial como cepas probióticas.

Vale la pena resaltar la investigación desarrollada You et al., (2006) en la que evaluaron las propiedades probióticas de *Candida kefyr* encontrando que la actividad enzimática fue mayor en amilasa ($0,33 \pm 1,12 \mu\text{mol} / \text{min} / \text{mg}$) y que el número máximo de esta levadura en la curva de crecimiento se alcanzó a las 30 h de fermentación. Además, *Candida kefyr* mostró altas resistencias al ambiente ácido, incluso a pH 2,0, y mostró una alta tolerancia a la sal biliar correspondiente a 97,2% de supervivencia en presencia de sal biliar al 1,0%. Sin dejar de lado, que presentó una alta estabilidad térmica a 60 ° C. y no fue inhibido en su totalidad por la tetraciclina. Estos resultados sugieren que *Candida kefyr* tiene propiedades útiles como probiótico.

Conclusiones

- La cepa de levadura KSPS 3'A mostró potencial probiotico, exhibiendo tolerancia a las condiciones del tracto gastrointestinal, Tales como: diferentes concentraciones de pHs, sales biliares, altas concentraciones de NaCl, actividad inhibitoria a patógenos, fermentación de glucosa y temperatura de 40°C.
- La identificación a nivel molecular dio como resultado que la cepa KSPS 3'A corresponde a la levadura *Kluyveromyces marxianus* con un 99% de identidad en el 100% de su longitud, por lo que se propone como cepa con potencialides probioticas.
- *Kluyveromyces marxianus* posee las características idóneas para la elaboración de un biopreparado que pueda ser probado en vacas lecheras de raza Gyr en el departamento de Sucre.

Referencias Bibliográficas

- Aguilera Díaz, M. M. (2005). La economía del departamento de Sucre: ganadería y sector público. Banco de La República-Economía Regional.
- Anderson, D. B., Mccracken, V. J., Aminov, R. I., Simpson, J. M., Mackie, R. I., Verstege, M. W., y otros. (1999). Gut microbiology and growth-promoting antibiotics in swine. *Pig News and Information*, 70(2), 115N-122N.
- Ávila, J., Ávila, M., Tovar, B., Brizuela, M., Perazzo, & Hernández, H. (2010). Capacidad probiótica de cepas del género *Lactobacillus* extraídas del tracto intestinal de animales de granja. *Revista Científica Universidad de Zulia-Venezuela*, 17(2), 161:169.
- Brizuela, M. (2003). Selección de cepas de bacterias ácido lácticas para la obtención de un preparado con propiedades probióticas y su evaluación en cerdos. Tesis Doctoral. ICIDCA, 101.
- Caja G., González E., Florez C., Carro M.D., Albanell e. (2003). Alternativas a los antibióticos de uso alimentario en rumiantes: probióticos, enzimas y ácidos orgánicos. XIX Curso de Especializacion FEDNA.
- Cardona Doria, J. A. (2014). Evaluación de las características probióticas de levaduras nativas aisladas de novillos en el departamento de

- Cordoba-Colombia. [Tesis de Maestría en Biotecnología] Montevideo - Cordoba, 4-54.
- Cavazzoni, V., A, A., & G, G. (1998). Performance of broiler chickens supplemented with *Bacillus coagulans* as probiotic. *British Poultry Science*, 30:526-529.
- Ceugniet Alexandre, Coucheney Françoise, Jacques Philippe, Daube Georges, Delcenserie Véronique, Ladrider Djame. (July-August de 2017). Anti-Salmonella activity and probiotic trends of *Kluyveromyces marxianus* S-2-05 and *Kluyveromyces lactis* S-3-05 isolated from a French cheese, Tomme d'Orchies. *Research in microbiology*, Volume 168, Issue 6, 575-582.
- Díaz Fajardo, M. J. (2013). Caracterización de levaduras y lactobacilos nativos con potencial probiótico aislado del estiércol de cerdo zungo costeño (*Sus scrofa domestica*), en San Pelayo - Córdoba. [Tesis de Maestría] Universidad de Córdoba, 103p.
- Diestra Balta, J., Aguilar, L. M., Vega Paulino, R., & Castillo Calderón, M. (2015). Modelación matemática del efecto de la temperatura en la actividad y la estabilidad térmica de la inulinasa de *Kluyveromyces marxianus* NRRL Y-7571. *Scientia Agropecuaria*, 6(4), 303-312.
- Dimas Hoyos, D. L. (2016). El sector agropecuario en el departamento de Sucre.
- Elmer GW., Corthier G. (1991). Modulation of *Clostridium difficile* induced mortality as a function of the dose and the viability of the *Saccharomyces boulardii* used as a preventative agent in gnotobiotic mice. *Canadian journal of microbiology*, 37(4):315-7.
- Estadística-DANE, D. A. (2014). COLOMBIA - Tercer Censo Nacional Agropecuario.
- FAO/WHO. 2005. Working principles for risk analysis for application in the framework of the Codex Alimentarius [Internet]. Codex Alimentarius Commission. Procedural Manual. 15th Edition. Joint FAO/WHO Food Standards Programme, Rome. Pp 101-107 (Disponible en: ftp://ftp.fao.org/codex/Publications/ProcManuals/Manual_15e.pdf Consultado: noviembre, 24, 2008.

- Fonseca GG, Heinzle E, Wittmann C, Gombert AK. (2008). The yeast *Kluyveromyces marxianus* and its biotechnological potential. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 79(3):339-54.
- Fonseca, Graciano Gustavo; de Carvalho, Nuno Miguel Barbosa; Gombert, Andreas Karoly. (23 February 2013). "Growth of the yeast *Kluyveromyces marxianus* CBS 6556 on different sugar combinations as sole carbon and energy source". *Applied Microbiology and Biotechnology*, 97 (11): 5055-5067.
- Fujimori S, Tatsuguchi A, Gudis K, Kishida T, Mitsui K, Ehara A, et al. (2007). High dose probiotic and prebiotic cotherapy for remission induction of active Crohn's disease. *J Gastroenterol Hepatol*, 2(8):1199-204.
- Giusiano, M. L. Mangiaterra. (1998). Diferenciación e identificación presuntiva rápida de levaduras con el medio CHROM-agar Candida . *Revista Argentina de Microbiología*, 30:100-103.
- Gilliland SE, Walker DK. (2004). Factors to consider when selecting a culture of *Lactobacillus acidophilus* as a dietary adjunct to produce a hypocholesterolemic effect in humans . *Journal of dairy science*, 73(4):905-11.
- Gouch S, Flynn O, Hack C, Marchant R. (1996). Fermentation of molasses using thermotolerant yeast, *Kluyveromyces marxianus* IMB3: simplex optimization of media supplements. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 46:187-90.
- Gómez Rodríguez, L. (2013). Informe especial: Colombia, uno de los países con insumos más costosos. *Revista Contexto Ganadero*, Una lectura rural de la realidad Colombiana. Colombia.
- Güneşler, Onur; Demirkol, Aslı; Karagül Yüceer, Yonca; Özmen Toğay, Sine; Çöketen Hoşoğlu, Müge; Elibol, Murat. (23 January 2015). "Bioflavour production from tomato and pepper pomaces by *Kluyveromyces marxianus* and *Debaryomyces hansenii*". "Bioflavour production from tomato and pepper pomaces by *Kluyveromyces marxianus* and *Debaryomyces hansenii*". *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 38 (6): 1143-1155.
- Kreger, V., & Rij, M. (1984). The yeasts. A taxonomy study.

- Kühle, A., Skovgaardb, K., Jespersen, L. (2005). In vitro screening of probiotic properties of *saccharomyces cerevisiae* strains. International Journal of Food Microbiology, 101, 29-39.
- Kumura , H., Tanoue , Y., Tsukahara , M., Tanaka , T., & Shimazaki, K. (17 de 11 de 2004). Screening of dairy yeast strains for probiotic applications. Journal of dairy science, 87(12), 4050-6.
- Kurtzman, edited by Cletus P.; Fell, Jack W.; Boekhout, Teun. (2011). The yeasts : a taxonomic study. Amsterdam: Elsevier ISBN 978-0-444-52149-1: (5th ed. ed.).
- Lane, Melanie M.; Burke, Niall; Karreman, Rob; Wolfe, Kenneth H.; O'Byrne, Conor P.; Morrissey, John P. (15 June 2011). "Physiological and metabolic diversity in the yeast *Kluyveromyces marxianus*". Antonie van Leeuwenhoek, 100 (4): 507-519.
- Looser, Christian; Urit, Thanet; Gruner, Erik; Bley, Thomas. (17 January 2015). "Efficient growth of *Kluyveromyces marxianus* biomass used as a biocatalyst in the sustainable production of ethyl acetate". Energy, Sustainability and Society, 5 (1).
- Maccaferri, S., Klinder , A., Brigidi, P., Cavina, P., & Costabile, A. (Febrero de 2012). Potencial probiótico *Kluyveromyces marxianus* B0399 Modulates the Immune Response in Caco-2 Cells and peripheral Blood Mononuclear Cells and Impacts the Human Gut Microbiota in an In Vitro Coloni Model System. Applied and Environmental Microbiology, 78(4), 956-964.
- Martínez, M., Gómez, C., Serpa, J. (2009). Diagnósticos de la calidad composicional e higiénico sanitaria de la leche cruda en centros de acopio y plantas procesadoras de del departamento de Sucre 2009. Universidad de Sucre.
- Mendoza Gardeazábal, A. S. (Mayo de 2013). Caracterización de la levadura *KLUYVEROMYCES MARXIANUS* como microorganismo probiótico. [Tesis de Maestría] Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo, 75p. San Agustín Tlaxiaca, Hgo.
- Mitsui, K., Yasui, H., Nakamura, N., Kanazawa, H. (2005). Oligomerization of the *Saccharomyces cerevisiae* Na⁺/H⁺ antiporter Nha1p: Implications for its antiporter activity. Biochim Biophys Acta; 1720: 125-136.

- Nerurkar, Alka; Solanky, Priti; Chavda, Nilesh; Baria, Hinal; Desai, Binita. (2012). "Isolation of Candida Species in clinical specimens and its virulence factor: The biofilm". International Journal of Medical Science and Public Health, 1 (2): 97.
- Ohgaki, R., Nakamura, N., Mitsui, K., Kanazawa, H. (2005). Characterization of the ion transport activity of the budding yeast Na⁺/H⁺ antiporter, Nhalp, using isolated secretory vesicles. Biochim Biophys Acta; 1712: 185-196.
- Organización Mundial de la Salud. (Octubre de 2004). Foro mundial FAO/OMS de autoridades de reglamentación sobre inocuidad de los alimentos. Organización de las naciones unidas para la agricultura y la alimentación.
- Pacheco, D. (2013). Caracterización de levaduras y lactobacilos nativos con potencial probiótico aislado del estiércol de gallinas ponederas (Gallus gallus)Lhomann, en Montería – Córdoba. [Tesis de Maestría] Universidad de Córdoba, 84p.
- Relling, A. y Mattioli, G. (2003). Fisiología Digestiva y Metabólica de los Rumiantes. EDULP.
- Rodríguez AC, Nardi RM, Bambirra EA, Vieira EC, Nicoli JR. (1996). Effect of Saccharomyces boulardii against experimental oral infection with Salmonella typhimurium and Shigella flexneri in conventional and gnotobiotic mice. Journal of Applied Bacteriology, 81(3):251-6.
- Rodríguez, J. M. (2015). Probióticos: del laboratorio al consumidor . Nutrición hospitalaria, 31(s01), 33-47.
- Rondón, A. J., Samaniego, L. M., Bocourt, R., Rodríguez, S., Milián, G., Rannilla, M. J., y otros. (2008). Aislamiento, identificación y caracterización parcial de las propiedades probióticas de cepas de lactobacillus sp. Procedentes del tracto gastrointestinal de pollos de ceba. Rev. Somenta, 6(1), 56-63.
- Rubio , M. A., Hernández , E. M., Aguirre, R. A., & Pouto, P. R. (2008). Identificación preliminar in vitro de propiedades probióticas en cepas de S. cerevisiae. Revista MVZ Córdoba, 13(1), 1157-1169.
- Salazar Alzate, B. C., Cortés Rodríguez , M., & Montoya Campuzano, O. (2016). Identification of some kefir microorganisms and optimiza-

- tion of their production in sugarcane juice. *Revista Facultad Nacional de Agronomía*, 69(2), 7935-7943.
- Salvatierra, M. A., Gamboa, M., & Arias, M. L. (2004). Evaluación del efecto de cultivos de probióticos presentes en yogurt sobre *Staphylococcus aureus* y la producción de termonucleasa. *Arch Latinoam Nut*, 54(3), 298-302.
- Seyis & N. Aksoz. (2004). Production of Lactase $\times$ *Trichoderma* sp. *Food Technol. Biotechnology*, 42 (2) 121-124.
- Van Vuuren, A. (2003). Role of Probiotics in Animal Nutrition and their Link to the Demands of European Consumers. International One-Day Seminar.
- Viegas C, Almeida, P., Cavaco, M., Correia, I. (1998). The H1-ATPase in the plasma membrane of *Sacharomyces cerevisiae* is activated during growth latency in Octanoic Acid-supplemented medium accompanying the decrease in intracellular pH and cell viability. *Applied and Environmental Microbiology*, 64:5.
- Yang, Chun; Hu, Shenglin; Zhu, Songli; Wang, Dongmei; Gao, Xiaolian; Hong, Jiong. (12 July 2015). "Characterizing yeast promoters used in *Kluyveromyces marxianus*". *World Journal of Microbiology and Biotechnology*.
- You, S., Cho, J., Ha, C., & Kim, C. (2006). Probiotic Properties of the *Candida kefyr* Isolated from kefir. *Journal of Animal Science and Technology*, 48(2), 307-314.
- Zavaglia, A. G., Kociubinski, G., Pérez, P., & De Antoni, G. (1998). Isolation and characterization of *Bifidobacterium* strains for probiotic formulation. *Journal Food Protection*, 61:865-873.

CAPÍTULO 9

EVALUACIÓN DE UN CONSORCIO DE MICROORGANISMOS CELULOLÍTICOS Y AMIOLÍTICOS EN EL COMPOSTAJE DE RESIDUOS AGROPECUARIOS DEL DEPARTAMENTO DE SUCRE

Yillcer Molina Durango²³
Luis Eliecer Oviedo Zumaque²⁴

23 Biólogo. Maestría en Biotecnología.

24 Licenciado en biología y química, Ingeniero Agrónomo. Especialidad en Suelos y Aguas. Maestría en Microbiología. Profesor de la Universidad de Córdoba.

Introducción

El manejo de los residuos sólidos constituye a nivel mundial un problema para las grandes ciudades, factores como el crecimiento demográfico, la concentración de población en las zonas urbanas, el desarrollo ineficaz del sector industrial o empresarial, los cambios en patrones de consumo y las mejoras del nivel de vida, entre otros, han incrementado la generación de residuos sólidos (Ojeda et al, 2008).

En Colombia, los procesos agrícolas, forestales y pecuarios suelen producir una considerable cantidad de desechos, los cuales no son aprovechados energéticamente, e incluso en ocasiones no cuentan con una disposición final apropiada, lo que produce más contaminación ambiental. El departamento de Sucre no está excepto a esta problemática pudiendo destacar los residuos orgánicos provenientes del sector agropecuario, consideradas una de las actividades económicas que genera una considerable cantidad de volumen. Donde se estima un área sembrada de 25.883 hectáreas, que equivalen al 2,9% del área total agropecuaria, se destacan la yuca y el ñame con las mayores áreas cultivadas (AGRONET, 2016). El sector pecuarios principalmente por la ganadería bovina, presenta el mayor aporte al PIB (Producto Interior Bruto) del departamento de Sucre, con una participación 21,1% con 880.495 cabezas de ganado (Aguilera, 2005). Los residuos producidos a partir de estas actividades tienen como disposición final en la mayoría de los casos en los sistemas de tratamiento de aguas residuales, en donde ocasionan el colmatado de los mismos debido a su lenta degradación ocasionando alto impacto ambiental (Acharya et al, 2012).

Estos desechos, según su naturaleza y composición química, pueden resultar útiles en diferentes campos; siendo el compostaje un método eficiente en la eliminación de estos residuos, que permite además el aprovechamiento del producto final, mediante un proceso con tecnología limpia, ya que la degradación se realiza, por la interacción de los microorganismos con los

residuos por medio de secreciones de enzimas hidrolíticas que tienen un papel fundamental en la despolimerización de los componentes orgánicos.

El compostaje es un proceso que tiene una duración variable, dado por la calidad de los residuos, el tamaño de partícula, disposición de la pila, relación carbono/nitrógeno, aireación, humedad y población biológica activa. El período de transformación es cercano a 180 días (Cariello, et al, 2007). Una alternativa para mejorar este proceso es la incorporación de células viables o latentes de microorganismos (hongos, bacterias filamentosas, no filamentosas y micorrizas) que han sido aislados de los insumos utilizados para compostar o de otros orígenes con capacidad de síntesis de enzimas hidrolíticas bajo diferentes condiciones de pH y temperatura que permitan acelerar el proceso (Granados y Rodríguez, 2007; Moreno, 2008).

En algunos estudios han realizado la inoculación de microorganismos a las pilas de compostaje, donde se han obtenido buenos resultados, viéndose aumentada la velocidad del proceso, al inocular la pila con *Streptomyces* spp, *Bacillus licheniformis*, *Phanerochaete*, *Pleurotus*, *Trichoderma* y *Aspergillus* (Chen et al, 2013; Tiquia, 2002). En trabajos desarrollados por De Carlo et al., (2001) ensayaron inóculos obtenidos con cultivos monomicrobianos de microorganismos extraídos de pilas de compostaje, no encontrando diferencias significativas en el tiempo de compostaje. Sin embargo, el inóculo constituyó un agregado significativo en número para producir una bioaumentación y la reducción del tiempo de formación y maduración del compost (De Carlo et al., 2001).

El objetivo de este trabajo fue evaluar el efecto de un consorcio de microorganismos con actividad celulolítica y amilolítica aislados de los residuos bovinaza, gallinaza y concha de yuca en el compostaje de tres mezclas de residuos agropecuarios producidos en el departamento de Sucre.

Caracterización físico-química de los residuos agropecuarios

Se recolectaron aproximadamente 80 kg de cada residuo agropecuario (bovinaza, gallinaza, concha de yuca y contenido ruminal), de los cuales se tomaron 10 gr y se sometieron a secado y molienda para su posterior análisis físico-químico. (RAS. 2000).

La determinación de los parámetros físico-químicos de los materiales a compostar es una de las variables más importantes a tener en cuenta, ya que de ellas depende el comportamiento del proceso de compostaje (Hurtado, 2014). La humedad del compostaje en gran parte está dada por la naturaleza estructural de los materiales, en los resultados se observa que el contenido ruminal fue el que mayor porcentaje de humedad presento con 80.4%, mientras que el mayor porcentaje de carbono orgánico lo tuvo la bovinaza y el porcentaje de nitrógeno más alto lo presentó la gallinaza, como se muestra en la tabla 5, indicando que la composición nutricional depende de la naturaleza de los los residuos orgánicos (Bonivento, 2012).

Tabla 5. Resultados de las pruebas físico-químicas de los residuos agropecuariosa compostar.

PARÁMETRO	RESIDUO			
	Bovinaza	Concha de yuca	Contenido ruminal	Gallinaza
Porcentaje de humedad %	60.3	78.92	80.4	31.54
pH	7.17	7.7	6.8	7.97
Carbono orgánico %	42	36	40.25	41
Nitrógeno total %	1.6	0.95	1.7	3.0

Fuente: cálculos del estudio

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos en la caracterización físico-química de los residuos agropecuarios, considerando que la relación C/N para comenzar el compostaje debe ser de 25:1 a 30:1 establecida por la FAO (1991) y los cálculos correspondientes a la ecuación establecida por Richard y Trautmann (1996), se determinó la cantidad necesaria de cada residuo para obtener las mezclas óptimas (Tabla 6).

Tabla 6. Composición de las mezclas para la evaluación del proceso de compostaje.

MEZCLA	Peso de los residuos agropecuarios (Kg)			
	Bovinaza	Concha de yuca	Contenido ruminal	Gallinaza
1	2	4	-	2
2	-	3.2	2	2.8
3	2	-	4	3

Fuente: cálculos del estudio

Determinación de características físicas y químicas durante el proceso de compostaje

Para establecer la dinámica del proceso de compostaje y marcar cada una de las etapas del proceso, y así de esta forma determinar el efecto de la inoculación del consorcio microbiano en la velocidad de maduración. Se hizo control y seguimiento durante un periodo de 74 días, en el que se evaluó la temperatura, el pH y la humedad; las cuales reflejan la actividad microbiana y la adecuada mineralización de la materia orgánica (Cronje et al. 2003).

• **Temperatura.**

De acuerdo con Fogiel (2003) la temperatura es la forma más conveniente y significativa de monitorear el progreso de una pila de compost, ya que ésta es el indicador más importante de la actividad metabólica de los microorganismos implicados, el calor de la pila es producido por la oxidación aeróbica de los subproductos por parte de la población microbiana asociada al proceso e indica el final de la fase bio-oxidativa en la cual el compost ha adquirido madurez, debido a que la curva de temperatura se estabiliza definitivamente, no variando con el volteo del material (Jiménez et al, 2008).

Las figuras 1, 2 y 3, ilustran el comportamiento de la temperatura en los compostajes de las tres mezclas en sus distintos tratamientos con la inoculación del consorcio microbiano. De acuerdo con las gráficas, se observa como en todos los tratamientos que recibieron inóculo alcanzaron

temperaturas más altas. Además, los picos más marcados se alcanzaron entre la cuarta y quinta semana de inicio del proceso mientras que en los tratamientos sin inóculo se alcanzó una semana después que el resto de los tratamientos.

En los tratamientos sin inóculo (T1, T5 y T9), se observa que la temperatura sube paulatinamente desde el inicio del proceso (fase mesófila) y continúa aumentando progresivamente hasta alcanzar su máximo en la quinta y sexta semana (fase termófila). A partir de esta fase, la temperatura empezó a disminuir hasta llegar a un rango de 35 a 34°C al momento de culminar las mediciones (74 días). Para los tratamientos T2, T3, T4, T6, T7, T8, T10, T11 y T12 (con 25, 50 y 75 ml/Kg de inóculo respectivamente) el efecto de la inoculación del consorcio microbiano en el comportamiento de la temperatura fue evidente, se estimuló la actividad microbiológica y la degradación de la materia en cada uno de los tratamientos, presentándose un aumento de la temperatura en la lectura siguiente a la semana inmediato a la inoculación de los microorganismos.

El comportamiento inicial de los tratamientos inoculados es semejante al presentado en los tratamiento sin inóculo, sin embargo en éstos, la fase termófila se presentó en la tercera semana con un promedio de temperatura de 40 a 47°C donde se adicionó nuevamente en inóculo con los microorganismos termófilos, se observa un descenso de la temperatura en varios tratamientos; lo cual, puede estar relacionado con el volteo de las mezclas para su aireación, luego se presenta un segundo aumento de la temperatura, alcanzando los mayores picos en la quinta semana, un tiempo menor al mostrado por los tratamientos sin inóculo, éste incremento de la temperatura de las pila es producido por la oxidación aeróbica de los subproductos por parte de la comunidad microbiana asociada al proceso, pues cuando estos respiran la temperatura incrementa por la producción de CO₂ liberado. Lo anterior, es fundamentado por Stentiford, (1996); Bonivento, (2012).

Es importante destacar que los picos más altos de temperatura (57– 61°C), coinciden con los tratamientos donde se adicionó la mayor inoculación del consorcio microbiano, más exactamente en los tratamientos T3, T4, T7, T8, T11 y T12 donde se adicionaron 50 y 75 ml/Kg del inoculo, respectivamente.

Después del segundo ascenso en la temperatura, ésta vuelve a descender, alcanzando al término de 1 mes y 25 días temperaturas similares a la del ambiente, esto posiblemente debido a la muerte de la microbiota termófila lo que se traduce al proceso de la segunda fase mesófila posterior a esto se presenta el inicio del proceso de maduración durante este tiempo algunos tratamientos presentaron la aparición de hongos visibles, los cuales son indicadores de la segunda fase mesófila. Lo anterior, es fundamentado por Meléndez y Soto, (2003); Sélimo, (2005).

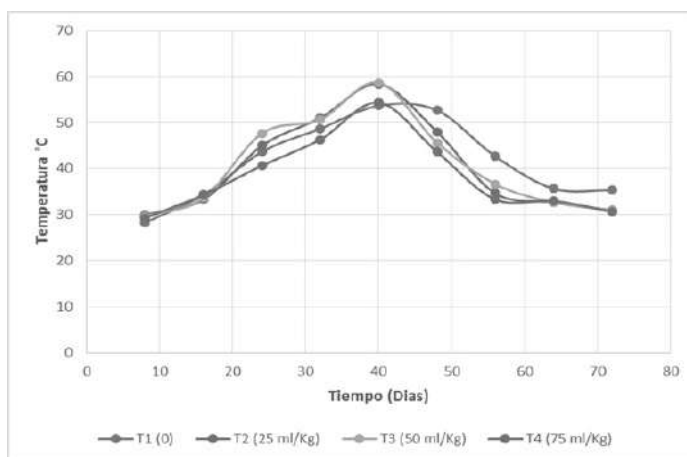


Figura 1. Temperatura en el compost de los tratamientos T1 a T4 en la mezcla 1.

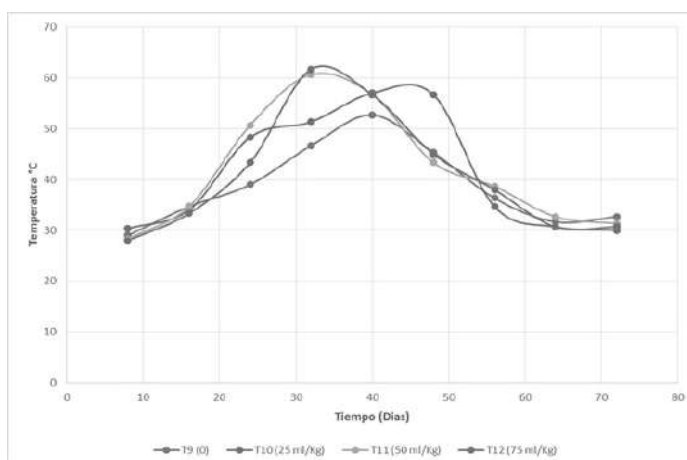


Figura 2. Temperatura en el compost de los tratamientos T5 a T8 en la mezcla 2.

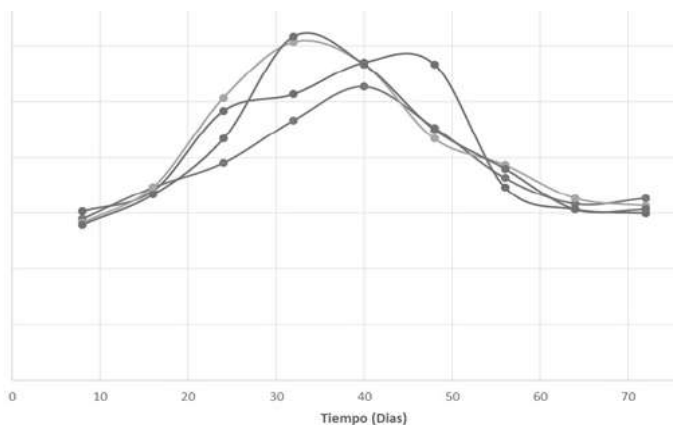


Figura 3. Temperatura en el compost de los tratamientos T9 a T12 en la mezcla 3.

El tiempo estimado de finalización del proceso de compostaje en los tratamientos con inoculación de microorganismos es aproximadamente 56 días, mientras que los tratamientos sin inóculo alcanzaron estabilización en las temperaturas después de 75 días. Haciendo evidente que la inoculación del consorcio microbiano redujo el tiempo de variación con respecto a la temperatura del compost y que fue más eficiente en los procesos inoculados con 50 y 75 ml/Kg. Lo cual es sustentado en los resultados reportados por Tortarolo et al, (2008); Laich (2011), Martinez et al, (2013) quienes afirman que la presencia de bacterias en gran número y su consumo de carbohidratos produce un aumento en la temperatura reflejado principalmente en las primeras 3 semanas de compostaje, producto de la altísima actividad microbiológica que se da en la composta al quemar la energía de los azúcares en el proceso de respiración de los microorganismos y además explican que al término de la sexta semana de observación el compost con inoculación ya ha alcanzado temperaturas cercanas a la ambiente, lo cual no se presentó en los tratamientos sin inóculo.

Con respecto a las mezclas de residuos utilizadas se obtuvo que las mayores temperaturas registradas 60 – 61°C, fueron las de los tratamientos con la mezcla 3 (Bovinaza, Contenido ruminal y gallinaza). Es posible que el incremento de la temperatura en estos tratamientos denote una alta actividad microbiana y también debida en parte al porcentaje de residuos agropecuarios mezclados, ya que según Van Heerden et al, (2002), la

fase termofílica del compostaje de residuos frescos se caracteriza por un incremento del grupo de microorganismos dominantes durante esta etapa. Por otra parte, entre mayor sea la diversidad biológica de los materiales, más rápido será el aumento de la temperatura en el compost.

De forma general, el comportamiento de la temperatura para todos los tratamientos fue acorde al dinamismo normal de la temperatura en los procesos de compostaje, y los picos de temperatura alcanzados en los tratamientos inoculados con el consorcio microbiano, confirman la importancia que adquiere la actividad enzimática microbiana en la elevación de la temperatura y más rápida descomposición de los residuos.

• **Humedad.**

La presencia de agua dentro de las mezclas durante el proceso de compostaje es de gran importancia, ya que es el medio por el cual se transportan las sustancias y nutrientes para que sean asimilados por los microorganismos presentes en el proceso. Las figura 4, 5 y 6, muestran el comportamiento promedio de la humedad en cada uno de los tratamientos por mezclas durante los 74 días en que se monitorio el compostaje.

En la mayoría de los tratamientos se observa una distribución uniforme del porcentaje de humedad en el proceso de compostaje, esto implica que se tiene un control del contenido de humedad.

Desde el inicio hasta el día 30, todas las mezclas presentaron un marcado descenso de la humedad, llegando a un porcentaje promedio de 45% siendo más evidente en los tratamientos T3, T4, T7, T8, T11 y T12 inoculados con 50 y 75 ml/Kg del consorcio microbiano. Este cambio de humedad implica que se perdió agua principalmente por evaporación debido a la alta temperatura que se alcanzó durante los primeros 30 días del compostaje, demostrando así que hay una relación directa entre la temperatura y el porcentaje de humedad, ya que en este tiempo transcurría la fase termófila y es donde se alcanzaron las mayores temperaturas. Los resultados de esta investigación son similares a los reportados por Franco y Urzúa, (2006), quienes utilizaron sustratos agroindustriales, lodo y desechos de mataderos, en el compostaje de estos residuos la humedad se mantuvo entre 35 y 45%. Al igual que los reportados por Martínez y Pérez, (2016), quienes en su estudio evaluaron el efecto de los microorganismos eficientes en el proceso de compostaje con estiércol bovino. Encontrando

que los porcentajes de humedad se mantuvieron entre el 40 y 70% de humedad.

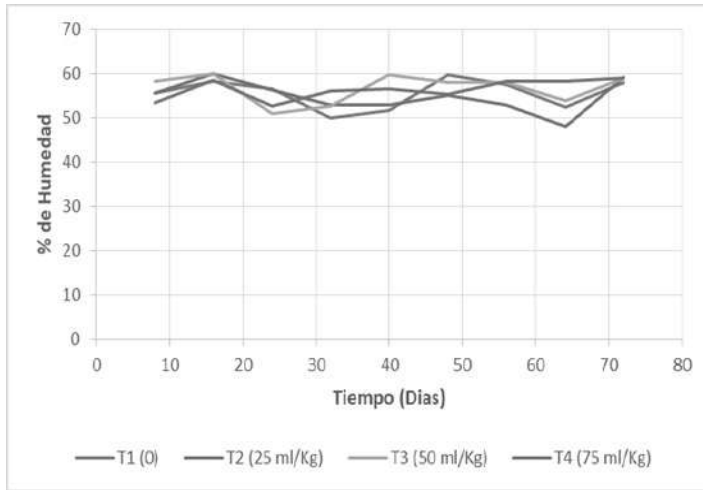


Figura 4. Humedad promedio registrada durante el compostaje de los tratamientos T1 a T4 en la mezcla 1.

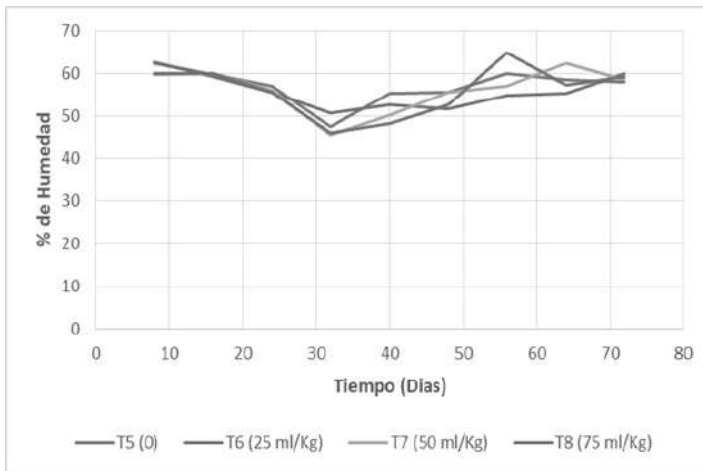


Figura 5. Humedad promedio registrada durante el compostaje de los tratamientos T5 a T8 en la mezcla 2

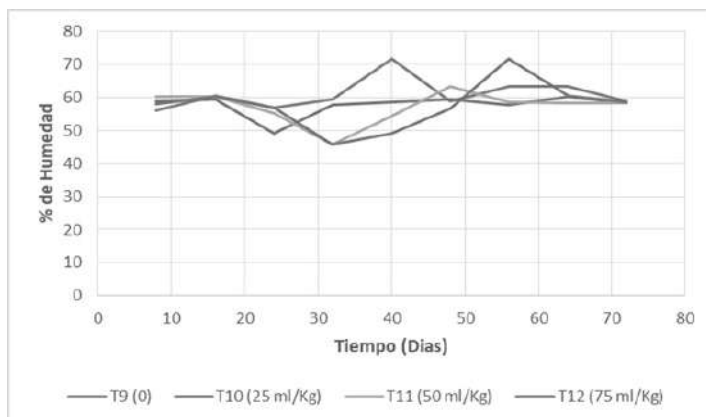


Figura 6. Humedad promedio registrada durante el compostaje de los tratamientos T9 a T12 en la mezcla 3.

La humedad al inicio del proceso presenta en un promedio de 55 a 62% en todos los tratamientos, el cual es apropiado para iniciar el proceso de compostaje, debido a que la humedad óptima para el crecimiento microbiano se encuentra en un rango entre 50 y 70%, por debajo de 30% la actividad biológica disminuye principalmente en las bacterias, ya que los hongos y actinobacterias permanecen activos a humedades más bajas y valores por encima de 70% afecta negativamente la disponibilidad de oxígeno y puede originar condiciones de anaerobiosis y un lavado de nutrientes por lixiviación como lo indica Uribe et al, (2001).

• pH.

El pH es un factor muy importante que influye sobre la actividad microbiana, es un parámetro que puede condicionar la actividad biológica que degrada la materia orgánica y puede seleccionar a las poblaciones microbiana presentes en cada momento, ya que las bacterias se desarrollan mejor en pH cercano a la neutralidad con un rango comprendido entre 6 - 7,5, mientras que los hongos se desarrollan mejor en medio ácido, aunque toleran un margen más amplio de pH (5-8). Sin embargo, el compostaje puede desarrollarse dentro de un amplio rango de pH (3-11), considerando como valores óptimos los comprendidos entre 5,5 y 8,0 (Negro et al. 2010).

Las figuras 7, 8 y 9 describen la variación del comportamiento promedio del pH de las tres mezclas durante los 74 días del proceso de compostaje. Se observa en las gráficas que independientemente del tratamiento con o sin adición del inóculo el dinamismo es muy similar,

iniciando los 12 tratamientos con un valor promedio de pH ligeramente ácido alrededor de 5.8 y 6.4. Es así como a partir del día 16 se observa un descenso en los niveles de pH en las mezclas, y a partir de este punto los tratamientos incrementan el pH alrededor de 7.3 y a partir del día 56 tienden a estabilizar el pH (6 a 7), manteniéndose sobre estos niveles hasta el final del proceso. Estos resultados se relacionan con lo mencionado por Martínez et al, (2008) quien encontró que la dinámica del pH muestra una tendencia a disminuir luego del primer volteo producto de una posible liberación de ácidos orgánicos y luego aumenta hacia el final del proceso en especial en los tratamientos con estiércol.

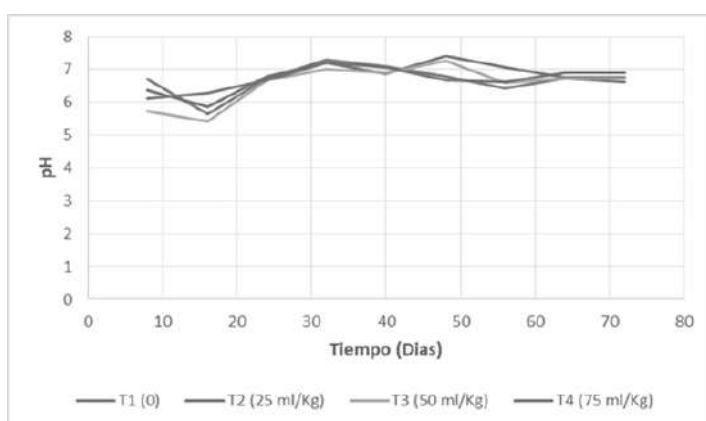


Figura 7. Variación del pH respecto al tiempo en los tratamientos T1 a T4 en la mezcla 1.

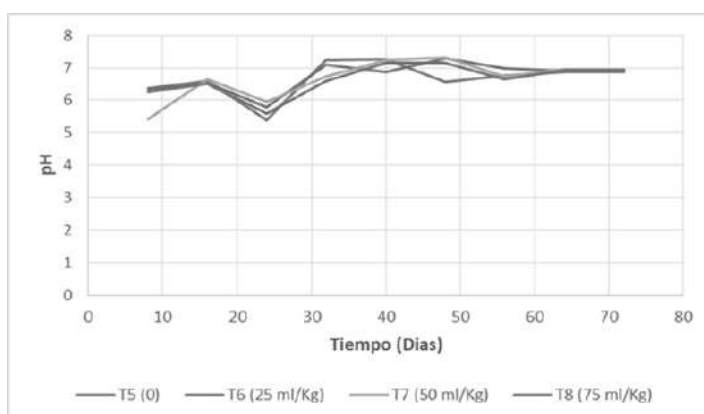


Figura 8. Variación del pH respecto al tiempo en los tratamientos T5 a T8 en la mezcla 2.

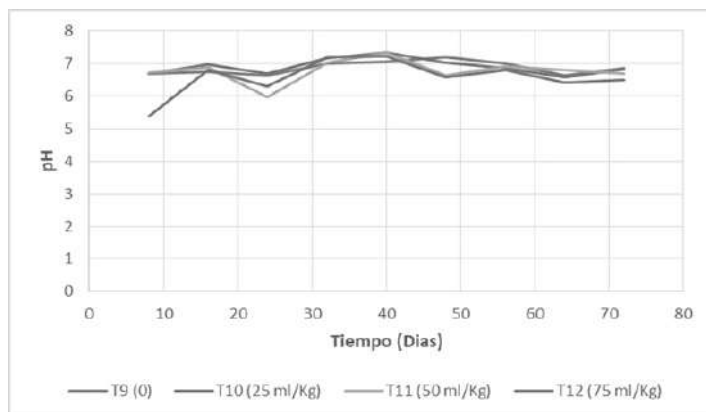


Figura 9. Variación del pH respecto al tiempo en los tratamientos T9 a T12 en la mezcla 3.

Según Sánchez (2001), la evolución del pH en el compostaje presenta tres fases. Durante la fase mesófila inicial se observa una disminución del pH a la formación de ácidos orgánicos durante el proceso de degradación de las fracciones de materia orgánica más lábiles por acción de los microorganismos. En una segunda fase se produce una progresiva alcalinización del medio, debido a la pérdida de ácidos orgánicos y la generación de amoníaco procedente de la descomposición de las proteínas y en la tercera fase el pH tiende a la neutralidad debido a la formación de compuestos húmicos que tienen propiedades tampón. Esto concuerda con lo dicho por Sundberg, (2005), quien plantea que la variación en el pH durante el proceso de compostaje se debe a cambios constantes en la composición química del sustrato, además que el pH está influenciado por tres sistemas acido-base: el sistema carbónico, con el dióxido (CO_2) que se forma durante la descomposición y puede escapar en forma de gas; el sistema amonio (NH_4^+) – amoníaco (NH_3), que se forma cuando se descomponen las proteínas y el sistema de ácidos orgánicos como el acético y el láctico. Estos sistemas se combinan para formar la curva típica del pH del compostaje, donde se presenta un descenso en la fase inicial, un aumento en la fase de máxima actividad y por último la tendencia a la estabilización, lo que se relaciona con los resultados obtenidos en el presente estudio.

Determinación de las características físicas evaluadas al final del proceso de compostaje

• Olor.

Al inicio del proceso las mezclas presentaban olores característicos de acuerdo con los sustratos utilizados en cada una. Al aumentar el proceso estos olores fueron disminuyendo a medida que los compuestos se degradaban.

Al finalizar el proceso ninguna de las mezclas presento olores desagradables y se ajusta a lo descrito por Canet (2007), que los olores generados por los residuos en las fases iniciales, causados principalmente por sustancias volátiles (ácidos orgánicos, amoníaco entre otros) desaparecen, dando al compost maduro un olor característico similar al de la tierra húmeda, producido fundamentalmente por la excreción de geosmina, metabolito secundario producido por los *Streptomyces*, los cuales predominan durante la fase de maduración del compost.

• Color.

La descomposición de los materiales de las mezclas a lo largo del proceso cambió gradualmente, las mezclas 1 y 2 presentaron color marrón en estado seco, pero en condiciones húmedas eran color marrón oscuro. Estos resultados están fundamentados en lo reportado por Canet (2007) quien argumenta que el compost toma un color marrón oscuro, casi negro debido al mayor grado de humificación de los residuos. También describe que el color final depende principalmente del material inicial; además el color también se debe a la degradación que sufrieron las diferentes mezclas que conformaron los diferentes tratamientos como la lignina, celulosa, la hemicelulosa entre otros. El color del compost también sirve como un indicador de la maduración o finalización del compostaje en cuanto al drenaje y aireación, porque no se distingue el color inicial de los diferentes tratamientos evaluados.

Así, en las mezclas que contenían más de un tipo de estiércol como la mezcla 3 que el color final fue generalmente más marrón.

Determinación de características químicas del compost.

- Relación Carbono-Nitrógeno (C/N).

El contenido de carbono orgánico (%) es considerado un índice de calidad del compost. La norma técnica colombiana (2004) indica que este parámetro debe tener un valor total alrededor del 15% al finalizar el proceso.

En la Tabla 7 se relacionan los resultados obtenidos para los parámetros carbono orgánico (CO), nitrógeno total (NT) y la relación C/N, en esta se observa que los valores de CO encontrados en los compost se aciertan en el rango exigido por la norma, siendo el tratamiento T9 con 16,12 % el que mayor porcentaje de CO obtuvo y T5 con 9,86% el de menor porcentaje. Sin embargo, se observó que para todos los tratamientos la cantidad de CO disminuyó con respecto a la que iniciaron el proceso de compostaje. Según Inbar et al, (1991) y Zmora et al, (2005) la disminución en el CO es un buen indicador de la madurez del producto final ya que las sustancias húmicas son resistentes a la degradación y la mayoría de sus componentes contienen CO en el compost maduro.

Tabla 7. Porcentaje de carbono orgánico (CO), nitrógeno total (NT) y la relación C/N final del compost en los tratamientos evaluados.

Tratamiento	CO (%)	NT (%)	C/N (%)
T1	11,53 ^j	1,26 ^d	9,15 ^f
T2	12,3 ^c	1,01 ^{fg}	13,21 ^b
T3	15,4 ^h	1,12 ^d	12,21 ^d
T4	15,2 ⁱ	1,15 ^e	13,75 ^a
T5	9,86 ^k	1,04 ^{ef}	9,48 ^{ef}
T6	11,53 ^j	1,05 ^g	10,98 ^c
T7	15,63 ^b	1,68 ^{ab}	9,3 ^{ef}
T8	14,96 ^d	1,74 ^a	8,59 ^g
T9	16,12 ^a	1,64 ^{bc}	9,82 ^e
T10	13,56 ^f	1,22 ^d	11,11 ^c
T11	12,93 ^g	1,22 ^d	10,59 ^{cd}
T12	14,2 ^e	1,33 ^c	10,67 ^{cd}

Fuente: cálculos del estudio. Promedios de C. orgánico y relación C/N (prueba de Tukey, $p>0.05$ y promedio de Nitrógeno con letras diferentes difieren significativamente (prueba de Kruskal Wallis, $p<0.05$).

Lo anterior, se complementa con lo reportado por Bernal et al, (1998) quienes encontraron que el CO está altamente correlacionado con la cantidad de carbono mineralizado, observando esto en siete compost realizados a partir de desechos agrícolas y residuos municipales. Las altas tasas de mineralización en un compost inmaduro pueden causar efectos perjudiciales sobre el crecimiento de las plantas ya que generan la competencia por el nitrógeno y el oxígeno.

El análisis de NT total reporta valores entre 1,01 y 1,74%. Los valores registrados se encuentran dentro del rango suministrado por la FAO (1991), quien considera que los niveles de NT adecuados en el compostaje oscilan entre 0,4 a 3,5%; este aspecto se sustenta además con Acosta y Peralta, (2015), los cuales realizaron compost a partir de residuos agrícolas donde encontraron valores entre 1.07 y 3.9% de nitrógeno; Hurtado, J. (2014) quien reportó valores de 0,81 y 0,83% y la FAO (1997) muestra criterios de evaluación de nitrógeno alrededor de 0,30%.

En la tabla 7 se observa la relación C/N de los tratamientos evaluados. Siendo los tratamientos T4 y T2 (13,75% y 13,72%) respectivamente, los que presentaron diferencias estadísticas con respecto a los demás tratamientos, siendo los tratamientos sin inóculo los que menor porcentaje de relación C/N presentaron (T1 9,15%, T5 9,48% y T8 8,59%). Según la NTC 5167 debe ser inferior a 25 y cercana a 15 según Ribeiro et al., (2007). De igual forma, Ballesteros, (2001) propone que el carbono disminuye debido a que el carbono se convierte en anhídrido carbónico, por lo cual la relación C/N debe alcanzar un valor cercano a 10/1 al concluir el proceso; esto concuerda con los resultados obtenidos por Kalil et al, (2007) donde después de 75 días de compostaje de residuos de plaza, poda y contenido ruminal, obtuvo una relación C/N final de 11.

Análisis de elementos mayores y menores.

A los productos obtenidos se les realizaron los análisis correspondientes para determinar su contenido de nutrientes al final del proceso de compostaje (74 días). Las Tablas 8 y 9 muestran los resultados obtenidos en el análisis de cada uno de los elementos estudiados.

De acuerdo con los resultados obtenidos el análisis de la materia orgánica (MO) reporta valores entre 30,12 y 34,73% en todos los tratamientos evaluados (Tabla 8), la FAO (1991), plantea que la materia

orgánica adecuada en los compostajes está en un rango de 25 a 80%, lo cual confirma que los niveles de MO obtenidos son acordes y funcionales para utilizarlos como enmiendas agronómicas o acondicionador del suelo. Lo anterior se corrobora con los resultados obtenidos por Huang et al, (2005) donde el porcentaje de MO al final del proceso de compostaje (63 días) se encontraba alrededor del 33%.

Los tratamientos que mayor porcentaje de MO obtuvieron fueron T4, T8 y T12 (33,11, 33,94 y 34,73%) respectivamente, que corresponden a aquellos que fueron inoculados con 75ml/Kg del consorcio microbiano. Las sustancias húmicas que hacen parte de la materia orgánica se forman por degradación química y biológica de los residuos vegetales y animales, y por actividades de síntesis llevadas a cabo por microorganismos del suelo (Román et al, 2013), lo anterior puede explicar la razón por la cual estos tratamientos tuvieron un mayor porcentaje de materia orgánica, ya que al estar en contacto con un mayor número de microorganismos con capacidad degradadora influyendo así en el resultado.

Defrieri, (2005) indica que la materia orgánica disminuye a medida que avanza el proceso de compostaje, y determinó en su estudio valores del 40%, así mismo que el contenido final será el resultado del valor inicial de MO, de su degradabilidad y de la transformación que haya sufrido durante el proceso. Soliva y López, (2004), afirman que este es un parámetro de gran importancia cuando se utiliza el compost como enmienda ya que incide de forma positiva sobre las propiedades físicas, químicas y biológicas del suelo.

Para el análisis de los elementos obtenidos se tuvo como referencia la tabla de datos de elementos químicos de suelo del Laboratorio de Análisis Químico de Suelos de la Universidad del Quindío.

En la Tabla 8 se observa la concentración de azufre registrada al final del compostaje de los diferentes tratamientos evaluados; se encontraron diferencias estadísticas entre los tratamientos, siendo T9 (180 ppm), T10 (160 ppm) y T11 (130 ppm) los que presentaron la mayor cantidad de azufre con respecto a los demás tratamientos, esto puede estar relacionado a que estos tratamientos tienen en común la mezcla de los residuos agropecuarios (mezcla 3), también puede estar relacionado con el uso

que le dio la microbiota a los componentes de estos residuos, las cuales contribuyeron a la liberación del fósforo.

Tabla 8. *Análisis de elementos mayores, menores y materia orgánica en los 12 tratamientos.*

TRATAMIENTO	PARÁMETRO					
	M.O	S	P	K	Ca	Mg
	%	ppm	ppm	meq/100	meq/100	meq/100
T1	32,41	40 ^f	32,1 ⁱ	28,92 ^h	21,92 ^j	5,81 ^h
T2	32,07	40 ^{ef}	46,9 ^{fg}	29,16 ^g	29,44 ^e	7,76 ^d
T3	32,60	70 ^{bc}	36,5 ^{cd}	31,20 ^c	33,89 ^c	8,2 ^c
T4	33,11	40 ^{ef}	71,7 ^{ab}	42,43 ^a	29,75 ^d	7,08 ^e
T5	31,92	30 ^f	35,8 ^{hi}	28,23 ^j	20,34 ^k	5,89 ^h
T6	30,12	60 ^{cd}	63,5 ^b	29,53 ^f	26,32 ^f	5,91 ^h
T7	31,83	50 ^{de}	57,4 ^c	29,85 ^e	24,06 ^h	5,91 ^g
T8	33,94	50 ^{de}	74,3 ^a	29,94 ^d	35,46 ^b	9,36 ^a
T9	31,79	180 ^a	52,1 ^{de}	27,24 ^k	25,58 ^g	5,44 ⁱ
T10	32,19	160 ^a	79 ^a	42,29 ^b	38,25 ^a	8,53 ^b
T11	31,79	130 ^{ab}	45,6 ^{gh}	25,75 ^l	23,68 ⁱ	4,42 ^j
T12	34,73	60 ^{cd}	48,4 ^{ef}	28,69 ⁱ	32,67 ^c	6,68 ^f

Promedios de elementos mayores y menores con letras diferentes difieren significativamente (prueba de Kruskal Wallis, $p < 0.05$).

Tabla 9. *Análisis de elementos mayores y menores en los 12 tratamientos.*

TRATAMIENTO	PARÁMETRO				
	Na	Fe	Cu	Zn	Mn
	Meq/100	ppm	ppm	ppm	ppm
T1	6,4 ^j	3080,67 ^{ef}	3,6 ^e	147,30 ^j	350,53 ^h
T2	5,0 ⁱ	4044,20 ^{ab}	4,91 ^b	192,90 ^e	407,90 ^f
T3	6,1 ^k	3474,43 ^d	4,93 ^b	197,60 ^d	433,20 ^c
T4	19,0 ^d	4454,93 ^a	5,56 ^a	216,00 ^b	466,47 ^b
T5	6,7 ⁱ	3297,60 ^{de}	3,66 ^e	134,60 ^l	321,83 ^j
T6	18,7 ^e	3523,03 ^d	4,58 ^c	180,20 ^f	432,20 ^d
T7	21,9 ^b	3717880 ^c	4,31 ^{cd}	170,60 ^g	410,43 ^e
T8	20,4 ^c	4306,67 ^a	4,95 ^b	211,40 ^c	445,80 ^a
T9	10,8 ^h	2423,13 ^{fg}	3,54 ^f	163,73 ^h	408,07 ^f
T10	23,4 ^a	2423,13 ^{bc}	5,37 ^a	247,13 ^a	521,13 ^a
T11	13,2 ^g	2041,03 ^g	2,80 ^f	139,60 ^k	337,53 ⁱ
T12	16,8 ^f	3323,97 ^d	3,75 ^d	158,43 ⁱ	358,30 ^g

Promedios de elementos mayores y menores con letras diferentes difieren significativamente prueba de Kruskal Wallis, $p < 0.05$).

El análisis del fósforo mostró diferencias significativas en tres de los tratamientos siendo T10 (79 ppm) y T8 (74,3 ppm) los que presentaron diferencias estadísticas con respecto a los demás tratamientos, los tratamientos que en menor cantidad de fósforo presentaron fue T1 (32,1 ppm), T2 (46,9 ppm), T5 (35,8 ppm) y T11 (45,6), sin embargo según la tabla de referencia para valorar estos resultados advierte que se califica como valores medios entre 20 y 40ppm y altos los que están por encima de 40 ppm. Los altos valores en la disponibilidad de fósforo coinciden con lo señalado por Singh, Maskina y Meelu, (1995), quien ha reportado incrementos en la disponibilidad de fósforo mediante la utilización de estiércol en los compostajes.

El contenido final de potasio se muestra en la tabla 8, en la cual el T4 (42,43 meq/100) es el que presenta mayor contenido de este elemento, además tiene una diferencia estadística significativa en relación con los demás tratamientos. El T10 tiene un contenido de 42,29 meq/100, los demás tratamientos no sobrepasan los 31,20 meq/100. Según la Tabla de referencia para valorar estos resultados advierte que se califican como valores altos los que están por encima de 0,40 meq / 100 gr. Lo anterior,

concuerta con FAO (1991), quien advierte que el potasio debe fluctuar en rangos de 0,4 a 1,6%, y los 12 tratamientos ofrecen valores que fluctúan entre 1,0 y 1,93% para este elemento.

Pérez et al, (2010) obtuvo resultados similares utilizando gallinaza la cual presenta un valor cercano al 1% para este elemento, y con bovinaza valores por encima de 1%. Estos resultados concuerdan con el presente estudio en el cual el T4 que contiene como sustrato inicial bovinaza, concha de yuca y gallinaza presento un valor final alto para el potasio.

El contenido de calcio, (Tabla 8), fue superior en el T10 (38,25 meq/100), seguido del T8 (35,46 meq/100), el menor contenido lo presento el T5 (20,34 meq/100). Hurtado, (2014) reporta para los tratamientos evaluados un contenido de calcio que están entre 34 y 50 meq/100, los cuales son muy parecidos a los resultados obtenidos en el presente estudio. Para el contenido de magnesio en la tabla 22, el T8 presentó un valor muy superior (9,36 meq/100) respecto a las demás muestras, las cuales tienen un contenido final en promedio de (6,51 meq/100), a excepción del T11 el cual presentó en nivel más bajo (4,42 meq/100). El Magnesio en el suelo se puede lixiviar más fácilmente que el calcio, pero si proviene de abonos orgánicos tiene menos peligro de perdida. (Muñoz, 2005). Esto plantea una de las muchas ventajas que tienen el compost como acondicionador del suelo.

Para el contenido de final de sodio en la tabla 9, los resultados indican que el T10 fue el presentó mayor concentración de este elemento (23,4 meq/100), seguido del T7 con un valor de (21,9 meq/100); además estos dos tratamientos presentan una diferencia estadística significativa en comparación con los demás tratamientos. Siendo el T2 el que presentó un menor contenido (5,0 meq/100).

En la Tabla 9 se representa el contenido de hierro en los 12 tratamientos. Los tratamientos T4 y T8 presentaron el mayor valor de este elemento (4454,93 y 4306,67 ppm) respectivamente, y además de tener una diferencia significativa con respecto a los demás tratamientos, pero no entre ellos. La alta concentración de hierro en estos tratamientos se puede deber al proceso de degradación que tuvo la mezcla y que ambos compartían esta misma (mezcla 1).

Para el contenido de cobre (Tabla 9), el tratamiento 4 presentó el mayor contenido (5,56 ppm) el cual mostró diferencias significativas, seguido de los tratamientos T2, T3 y T8 (4,91, 4,93 y 4,95 ppm) respectivamente, entre los cuales no hubo diferencias significativas, pero si con el resto de tratamientos. Siendo T9 y T11 los que menor contenido de este elemento presentaron (3,54 y 2,80 ppm) respectivamente.

En lo que respecta, al contenido de zinc, el tratamiento 5 presentó el valor más alto (134,60 ppm), seguido del tratamiento 4 (216,00 ppm). El menor contenido lo presentó el tratamiento 5 (134,60 ppm). Durán y Henríquez, (2007) reporta que en 3 de los 5 vermicompost evaluadas se obtuvieron valores mayores a (279 mg/Kg), en particular el tratamiento en el cual se utilizaron residuos domésticos.

El contenido de manganeso (Tabla 9), se observa que en los tratamientos 8 y 10 presentaron el mayor contenido (445,80 y 521,13 ppm) respectivamente y los que presentaron diferencias estadísticas con respecto a los demás tratamientos, mientras que los tratamientos 5 y 11 fueron los que menor contenido de este elemento presentaron (321,83 y 337,53 ppm) respectivamente.

En general, se puede concluir que los compost obtenidos de cada tratamiento cumplen con las cantidades de elementos mayores y menores establecidas por la FAO (1991), siendo los tratamientos T4, T8 y T10 los que sobresalieron reportando los valores más altos para los minerales evaluados (Tablas 8 y 9), cabe destacar que estos tratamientos fueron tratados con el inóculo del consorcio microbiano evaluado a concentraciones de 75ml/Kg (T4 y T18) y 50ml/Kg (T10), lo que indica que la adición del inóculo influye de forma positiva sobre el proceso de descomposición y mineralización de los residuos agropecuarios compostados.

Los compostajes que se produjeron a partir de los 12 tratamientos, por su contenido nutricional los hacen sin duda un material proporcionado para ser usado como mejoradores del suelo o abono orgánico, esto concuerda con lo argumentado por Suquilanda (1996), quien expresa que, al incorporar compost, se mejoran las propiedades químicas, aumenta el contenido en macro nutrientes N, P, K y micro nutrientes y mejora la actividad biológica del suelo.

Conclusiones

El potencial de compostaje del consorcio de los microorganismos estudiados fue positivo ya que el valor de la relación C/N, tradicionalmente utilizada para establecer el grado de madurez de una composta, bajó considerablemente durante el proceso. Así mismo, se observó en la variable temperatura donde los picos más altos de temperatura (57– 61°C), se presentaron en los tratamientos donde se adicionó la mayor inoculación del consorcio microbiano, (tratamientos T3, T4, T7, T8, T11 y T12) donde se adicionaron 50 y 75 ml/Kg del inóculo, respectivamente.

El tiempo de madurez del compost obtenido con la inoculación del consorcio microbiano en los 74 días del proceso logró disminuirse en los tratamientos inoculados con el consorcio microbiano a 50 y 75 ml/Kg, lo que sugiere que la adición del inóculo influye de forma positiva sobre el proceso de descomposición y mineralización de los residuos agropecuarios compostados, acelerando el proceso y ser utilizado en corto tiempo para el mejoramiento de la calidad de suelos pobres.

El compostaje inoculado con el consorcio microbiano con actividad celulolítica y amilolítica es una alternativa que puede mejorar la disposición final de los residuos agropecuarios generados en el departamento de Sucre, contribuyendo a la recuperación y el reciclaje de nutrientes.

Referencias Bibliográficas

- Acharya A, Joshi D, Shrestha K, Battha D. (2012). Isolation and screening of thermophilic cellulolytic bacteria from compost piles. *Scientific World*. Volume 10(10), 43-46
- Acosta, W y Peralta, M. (2015). *Elaboración De Abonos Orgánicos A Partir Del Compostaje De Residuos Agrícolas En El Municipio De Fusagasugá*. Universidad De Cundinamarca. Fusagasugá, Colombia.
- Aguilera M. (2005). *La Economía Del Departamento De Sucre: Ganadería Y Sector Público*. Ed 64. Documentos de Trabajo sobre Economía Regional y Urbana. (pp 2-126). Cartagena, Colombia: Banco de la República.
- AGRONET (La red de información y comunicación del Sector Agropecuario Colombiano), (2016). Recuperado de <https://www.agronet.gov.co/estadistica/Paginas/home.aspx?cod=4>.

- Ballesteros, M. (2001). Caracterización química de procesos de compostaje, determinación de parámetros de calidad de compost y evaluación del efecto sobre el aluminio en un oxisol. Tesis de pregrado en Química. Universidad Nacional de Colombia. Facultad de Ciencias. Departamento Química. Bogotá. 1-18p.
- Bernal, M., Navarro, A.F., Sanchez-Monedero, M., Roig, A y Cegarra, J. (1998). Influence of sewage sludge compost stability and maturity on carbon and nitrogen mineralization in soil. *Soil Biology & Biochemistry* 30: 305–313.
- BID (Banco Interamericano de desarrollo), (2009). Manual Práctico de Uso de EM. Edición N° 1. Recuperado de http://www.emuruguay.org/images/Manual_Practico_Uso_EM_OISCA_BID.pdf
- Bonivento, J. (2012). Producción de lombricompost de diferentes mezclas de residuos agropecuarios en el departamento de Córdoba, Colombia. Tesis para optar el título de Magister en biotecnología. Universidad de Córdoba. Montería, Colombia.
- Canet, R. (2007). Uso de la materia orgánica en la agricultura. Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias. España. 11-17.
- Cariello, M. E., Castañeda, L., & Riobo, I. (2007). Inoculante de microorganismos endógenos para acelerar el proceso compostaje de residuos sólidos urbanos. *RC Suelo Nutr. Veg*, 7(3), 26-35.
- Chen, T. T., Wang, L. F., Wang, O., & Han, J. R. (2013). Isolation and identification of thermophilic actinomycetes in asparagus old stem compost. *J. Shanxi Agr. Sci*, 1, 40-45.
- Cronje, A., Turner, C., Williams, A. (2003). Composting under controlled conditions. *Environmental Technology*. 1221-1234.
- De Carlo, E. B., Rosa, A. T., Benintende, S., Cariello, M. E., Castañeda, L., Figoni, E., & Mascheroni, F. (2015). ESTUDIO DE LA PUBLACIÓN MICROBIANA EN LAS ETAPAS INICIALES DEL COMPOSTAJE. *Ceres*, 48(280).
- Defrieri, R. (2005). Utilización de parámetros químicos y microbiológicos como criterios de madurez durante el proceso de compostaje. Facultad de Agronomía. UBA. Buenos Aires. Argentina 22(1): 25-31.
- FAO. (1991). Manejo del suelo. Producción y uso del compost en ambientes tropicales y subtropicales. Roma (Italia). p. 312.

- FAO. (1997). China: Reciclaje de desechos orgánicos en la agricultura. (40): 2, 9, 12, 15.
- Fogiel, AC, Bernuth, FC. Michel JR and Loudon TL. (2003). Experimental verification of the natural convection transfer of air through a dairy manure compost media. Proceedings of the International Meeting of the American Society of Agricultural Engineers; ASAE, St. Joseph, MI: ASAE paper no. 994053.
- Franco, De La J y Urzúa PI. (2006). Informe: Analisis de compost. Asesoría a la planta de compostaje Ecomaule S.A. Universidad de Talca, Perú, 20p.
- Granados, V y Rodríguez, D. (2007). Evaluación de un inoculante microbiano en el proceso de compostaje en un cultivo de flores. Tesis de Pregrado. Pontificia Universidad Javeriana, Bogotá, 19-21, 33.
- Huang. G., Wu Q., Wong. J y Nagar. B. (2005). Transformation of organic matter during cocomposting of pig manure with sawdust. *Biore-source Technology* 97: 1834-1842
- Hurtado, J. (2014). Evaluación del efecto acelerador de microorganismos transformadores de materia orgánica (TMO) en el proceso de compostaje de las deyecciones de bovinos, porcinos y conejos. Tesis de Maestría. Universidad de Manizales. Manizales, Colombia.
- IGAC, I. D. (2006). Métodos Analíticos del Laboratorio de Suelos. Análisis de pH, Método relación Agua: Suelo, 73-75.
- Inbar, Y., Chen, Y y Hadar, Y. (1991). Carbon-13 CPMAS NMR and FTIR spectroscopic analysis of organic matter transformations during composting of solid waste from wineries. *Soil Science*. 152, 272-282.
- Jiménez, E. I., Silva, M. T. B., & Egea, F. C. M. (2008). II. Indicadores de la estabilidad y madurez del compost. *Compostaje*, 243.
- Kalil, S., Casas. J y Martínez. M.M. (2007). Seguimiento del proceso de humificación en compost inoculado. Tesis de Pregrado. Pontificia Universidad Javeriana. Facultad de Ciencias. Departamento de Microbiología. Bogotá, 32- 69.
- Laich, F., & Andrade, J. (2016). *Penicillium pedernalense* sp. nov., isolated from whiteleg shrimp heads waste compost. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 66(11), 4382-4388.

- Martínez Gutiérrez, G. A., Íñiguez Covarrubias, G., Ortiz-Hernández, Y. D., López-Cruz, J. Y., & Bautista Cruz, M. A. (2013). Tiempos de apilado del bagazo del maguey mezcalero y su efecto en las propiedades del compost para sustrato de tomate. *Revista internacional de contaminación ambiental*, 29(3), 209-216.
- Martínez, R., Miglierina, A., Luna, M., Konijnenburg, A y Pellejero, G. (2008). Evaluación del compostaje de los residuos Del procesamiento de la cebolla. Universidad Nacional Del Comahue. Argentina. (9), 3.
- Meléndez, G., & Soto, G. (2003). Indicadores químicos de calidad de abonos orgánicos. Abonos orgánicos: Principios, características e impacto en la agricultura. Ed Meléndez, G. San José, Costa Rica, 50-63.
- Mendiburu, F. (2016). *Agricolae: Statistical Procedures for Agricultural Research*. R package version 1.2-4. <http://CRAN.R-project.org/package=agricolae>.
- Moreno Casco, J., & Moral Herrero, R. (2008). Compostaje (No. F04 MOR 18358). Ediciones Mundi-Prensa.
- Muñoz, J. (2005). Compostaje en pescador, cauca: tecnología apropiada para el manejo de residuos orgánicos y su contribución a la solución de problemas medioambientales. Universidad Nacional de Colombia. 30-38.
- Negro, M.J., Villa, F., Aibar, J., Alarcón, R., Ciria, M.P., Cristóbal, M.V., de Benito, A., García-Martín, A, García-Muriedas, G, Labrador, J, Lacaste, C., Lezaun, J.A., Meco, R., Pardo, G., Solano, M.L, Torner, C., Zaragoza, C. (2010). Producción y gestión del compost.
- Ojeda, S., Lozano, G., Quintero, M., Whitty, K., & Smith, C. (2008). Generación de residuos sólidos domiciliarios por periodo estacional: el caso de una ciudad mexicana. In I Simposio Iberoamericano sobre Ingeniería de Residuos REDISA (pp. 23-24).
- Pérez, R, Pérez, A, y Vertel, M. (2010). Caracterización nutricional, fisiocoquímica y microbiológica de tres abonos orgánicos para uso en agroecosistemas de pasturas en la subregión Sabanas del departamento de Sucre. Colombia. 5: 27-37.

- R core team. (2017). R: A language and enviroment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL <https://www.R-project.org/>.
- RAS, Colombia. Ministerio de Desarrollo Económico. Dirección General de Agua Potable y Saneamiento Básico. (2000). Documentación técnico normativa del sector de agua potable y saneamiento básico. Acodal.
- Ribeiro. H., Romero. A., Pereira. H., Borges. P., Cabral. F y Vasconcelos, E. (2007). Evaluation of a compost obtained from forestry waistes and solid phase of pig slurry as a substrates for seedlings production. Biosource Technology 98: 3294- 3297.
- Richard, T., y Trautmann, N., (1996). C/N Ratio. The Science and Engineering of Composting (on line). Cornell Composting. Science and Engineering. Cornell Waste 86 Management Institute. Internet: <http://compost.css.cornell.edu/calc/2.html>.
- Sánchez, M. (2001). Nitrogen transformation during organic waste composting by the Rutgers system and its effects on pH, EC and maturity of the composting mixtures. 78(3), 301-308.
- Sélimo, MJ. (2005). Compostaje En Pescador, Cauca: Tecnología Apropia-da Para El Manejo De Residuos Orgánicos Y Su Contribución A La Solución De Problemas Medioambientales. Trabajo de grado. Universidad Nacional de Colombia sede Palmira, 80p.
- Singh, O., Singh, M., Maskina, S. y Meelu. O. (1995). Response of wetland rice to nitrogen from catle manure and urea in rice wheat rotation. Trop. Agric.72:91-96.
- Soliva, M., y López, M. (2004). Calidad del compost: Influencia del tipo de materiales tratados y de las condiciones del proceso. Escola Superior d'Agricultura de Barcelona. España. 1-17.
- Stentiford, E. I. (1996). Composting control: principles and practice. In The science of composting (pp. 49-59). Springer, Dordrecht.
- Sundberg, C. (2005). Improving Compost Process Efficiency by Controlling Aeration, Temperature and pH. University Uppsala. Suecia. 103.

- Suquilanda, M. (1996). Agricultura orgánica, alternativa tecnológica del futuro. Edic. UPS, Fundagro. Quito-Ecuador.
- Tiquia, S. M. (2002). Evolution of extracellular enzyme activities during manure composting. *J. Appl. Microbiol.* 92, 764-775.
- Tortarolo, M F; Pereda, M, Palma, M, & Arrigo, N M. (2008). Influencia de la inoculación de microorganismos sobre la temperatura en el proceso de compostaje. *Ciencia del suelo*, 26(1), 41-50. Recuperado en 22 de septiembre de 2017.
- Uribe, J.F, Estrada, M., Córdoba, S., Hernández, L.E. and Bedoya, D.M. (2001). Evaluación de los Microorganismos eficaces (E. M) en producción de abono orgánico a partir del estiércol de aves de jaula. *Rev.colomb.cienc.pecu*, 14(2), p162-170.
- Van Heerden, I; Cronjé C; Swart SH & Kotzé JM. (2002). Microbial, chemical and physical aspects of citrus waste composting. *Bioresource Technology* 81: 71-76
- Zmora-Nahum, S., Markovitch, O., Tarchitzky, J., Chen Y. (2005). Dissolved organic carbón (DOC) as a parameter of compost maturity. *Soil Biology & Biochemistry* 37: 2109–2116.

CAPÍTULO 10

EVALUACIÓN DEL POTENCIAL PROBIÓTICO DE CEPAS DE BACTERIAS Y LEVADURAS AISLADAS EN ESTIÉRCOL DE TERNEROS DE LEVANTE DE RAZA BRAHMAN EN EL DEPARTAMENTO DE SUCRE

Marcela Argumedo García²⁵

César Betancur Hurtado²⁶

Luty Gomezcáceres Pérez²⁷

25 Biólogo. Maestría en Biotecnología

26 Medicina Veterinaria y Zootecnia, Especialista en ecología, Maestría en Fisiología. Profesor de la Universidad de Córdoba.

27 Bacterióloga, Especialista en aseguramiento de la calidad Microbiológica. Maestría en Agricultura del Trópico Húmedo. Estudiante de Doctorado. Profesora en Corporación Universitaria del Caribe - CECAR

Introducción

El levante de novillas es una de las etapas básicas en toda explotación lechera, debido a que conforman el reemplazo de los animales que anualmente deben abandonar el hato por problemas productivos, reproductivos, sanitarios y de edad, razón por la cual los terneros en esta fase demandan especial cuidado en su manejo, por ser la segunda etapa más crítica del desarrollo y determinar en gran medida el inicio de la eficiencia del proceso completo (FEDEGAN, 2000; Cueva, 2014). No obstante, la disponibilidad de novillas destinadas a cumplir esta función, frecuentemente es afectada por prácticas deficientes de alimentación, retardando el inicio de la vida reproductiva a causa de problemas de salud en las becerras, principalmente por el mal suministro de calostro, alimentación con sustituto de leche de baja calidad, cambios abruptos en la dieta y situaciones de estrés (Soto et al., 2011). Lo cual, genera desbalances causados por la presencia de bacterias entéricas, las cuales provocan disminución en la digestión y absorción de nutrientes y por lo tanto, el retardo en la producción, situación que ha sido documentada por Armstrong et al (1988) y Parker y Armstrong (1987), sin contar con otros factores que pueden inducir la ruptura del equilibrio intestinal, como las diarreas que disminuyen considerablemente la barrera inmune, al posibilitar a los patógenos, la implantación, adhesión y proliferación en las células epiteliales del intestino (Gaggia, Mattarelli & Biavati, 2010).

Esta problemática ha suscitado la suplementación de las dietas con antibióticos, que son efectivos como promotores del crecimiento. Sin embargo, la administración inadecuada de estos compuestos ha generado diversos problemas como el incremento en la resistencia bacteriana, la pérdida de la microbiota intestinal benéfica y el aumento en los niveles de residuos de antibiótico que quedan en la carne y en los subproductos de la misma (Wallace, 1992; Linton, et al., 1988; Torres et al., 2002). El uso de probióticos es una de las alternativas naturales al uso de los antibióticos promotores de crecimiento, ya que al ser administrados en cantidades adecuadas reducen la mortalidad, producen mejor digestibilidad,

ganancia en peso y mayor índice de conversión alimentaria (Gutiérrez, Montoya y Vélez, 2013), sin contar que estimulan el crecimiento de los microorganismos benéficos y suprimen los patógenos por competencia y producción de ácido láctico (Freitas et al., 2003). Además, su consumo en la alimentación animal es una de las formas de generar producción limpia y desarrollo competitivo a gran escala, sin efectos colaterales en el animal ni en sus productos (Gutiérrez, Montoya y Vélez, 2013).

La adopción de nuevos procesos biotecnológicos es la herramienta para cambiar la manera de producción del ganadero manteniendo y mejorando su posición en el mercado interno hasta poder acceder a mercados internacionales. Además, no todas las fincas lecheras están certificadas, lograrlo desde buenas prácticas de manejo, brindaría beneficios al productor a nivel social y económico, debido a que se crea personal capacitado con mejores aptitudes; se mejora la inocuidad de la leche y como resultado se protege la salud de los consumidores y se preserva la calidad del medio ambiente (Taborda, 2011). Asimismo, la ganadería sería más competitiva puesto que se lograría un máximo rendimiento productivo en cuanto a cantidad y calidad de los productos para que su costo sea el más bajo posible y prevenga la aparición de trastornos digestivos o metabólicos (Villena & Jiménez, 2002).

El desconocimiento de los microorganismos con potencial probiótico proveniente del estiércol bovino y las pocas investigaciones realizadas por falta de tecnologías y carencia de animales fistulados en el departamento de Sucre, están dejando de lado el aprovechamiento del mismo para que las organizaciones ganaderas adquieran gran importancia económica haciendo uso de probióticos de cepas autóctonas de la región, obtenidas a bajo costo y a partir de materias primas baratas, debido a que los probióticos comercializados son importados y tienen un alto costo (Wannaprasat et al., 2009). Bajo este contexto, la presente investigación tuvo como objetivo evaluar el potencial probiótico de cepas de bacterias y levaduras provenientes de estiércol de terneros de levante de raza Brahman en el departamento de Sucre.

Metodología.

Tipo y sitio de estudio: el presente estudio es de tipo experimental.

Fase de campo

Las muestras de estiércol fueron colectadas en 3 fincas ubicadas en los municipios de Toluviéjo, Sincelejo y Corozal en el departamento de Sucre, ubicado entre los 9° 18' 0"N, latitud Norte y 75° 24' 0"O longitud Occidente al norte del país, en la región Caribe de Colombia. Limita al norte y al oriente con el departamento de Bolívar, al noroccidente con el mar Caribe, en el golfo de Morrosquillo, al sur y occidente con el departamento de Córdoba.

Fase de laboratorio

Las muestras fueron analizadas en el laboratorio de Biotecnología GRUBIODEQ de la Universidad de Córdoba, ubicada entre los 8°47'16"N, latitud Norte y 75°51'28"O longitud Occidente en el departamento de Córdoba – Colombia.

Población y muestra

La población corresponde al total de ganado bovino de levante de raza Brahman y las muestras fueron colectadas en forma aleatoria con un nivel de confianza del 95%.

Este estudio fue realizado en 4 fases:

Fase 1. Caracterización de bacterias y levaduras

Aislamiento de los microorganismos: a partir de estiércol bovino de 9 terneros en levante provenientes de las fincas seleccionadas en los respectivos municipios, con edades promedio de 8 a 12 meses, alimentados a base de forraje, sin tratamiento con antibiótico y antiparasitarios, fueron aisladas bacterias ácido lácticas y levaduras. Para ello, se utilizaron medios selectivos como son: Agar De Man Rugosa Sharpe (MRS) (*Lactobacillus* sp), Agar Nutritivo modificado, suplementado con Carboximetil Celulosa CMC y almidón al 0,1% (*Bacillus* sp) y Agar Sabouraud Dextrose (SDA) (*Saccharomyces* sp) teniendo en cuenta las condiciones de crecimiento (Rondón et al., 2008). A cada cepa aislada se le realizó tinción de Gram

y de endosporas, y fueron sometidas a la prueba de catalasa y oxidasa e incubadas a 36°C por 24 hrs. Para *Lactobacillus* sp: fueron seleccionadas aquellas cepas catalasa negativa, oxidasa negativa y bacilos Gram positivos en cadenas no esporulados (Kandler & Weiss, 1986).

Fase 2. Determinación de la actividad probiótica in vitro

A un inóculo (10^6 UFC/mL) de cada uno de los microorganismos se le realizaron las siguientes pruebas en triplicado:

Tolerancia a cambio de pH: Las cepas de bacterias fueron evaluadas diferentes valores de pH, 3, 4, 5.6, 7 (incubación a 37 °C durante 24 hrs). La sobrevivencia y resistencia se comprobó al comparar el conteo de microorganismos viables del inóculo con las células sobrevivientes después de la incubación a diferentes valores de pH de acuerdo con Zavaglia et al., 1998. El porcentaje de resistencia fue calculado por la siguiente ecuación: $\% R_{pH} = [(UFC/mL)_{MRS\ pH} \times 100] / (UFC/mL)_{MRS\ (in\acute{o}culo)}$ (Kociubinski et al., 1999). Se estableció como criterio de selección escoger aquellas cepas que resistieron el pH por encima del 50%.

Tolerancia a sales biliares: El ensayo fue realizado en soluciones con diferentes concentraciones de sales 0.05, 0.1, 0.15 y 0.3 % p/v ajustado el pH =7 con HCl 5% (incubación a 37 °C durante 24 hrs). Al cabo de este tiempo la sobrevivencia y resistencia a sales biliares se comprobó mediante la determinación del número de células viables (UFC) (Brizuela, 2003; Rubio et al., 2008, Rondón et al., 2008; Ávila et al., 2010)

Tolerancia a diferentes temperaturas: Las cepas fueron probadas a dos temperaturas, 30 y 40 °C durante 24 hrs. La sobrevivencia y resistencia a estas temperaturas se comprobó mediante la determinación del número de células viables (UFC) (Rubio et al., 2008, Rondón et al., 2008; Ávila et al., 2010)

Tolerancia a diferentes concentraciones de NaCl: La prueba se realizó utilizando caldos MRS y YPD con diferentes concentraciones de NaCl, 2, 4, 7 y 10 % p/v, (incubación a 37 °C durante 24 hrs), finalizado el tiempo se determinó el crecimiento a altas concentraciones de NaCl mediante la medición de la densidad óptica (DO) a 600 nm a 24 hrs (Rondón et al., 2008)

Fermentación de la glucosa: Se utilizaron los caldos MRS y YPD, que contenían 0,2% v/v de una solución de purpura de bromocresol (0,5%) y campanas de Durham. La producción de gas se evidenció mediante la presencia de gas en las campanas y luego de incubación a 37 °C durante 48 hrs (Rubio et al., 2008, Rondón et al., 2008).

Prueba de antagonismo: Esta prueba fue realizada contra *Salmonella* sp, *Pseudomona aureginosa* y *E. coli*, las cuales fueron sembradas en forma masiva en agar Mueller hinton. En la superficie de estos fueron colocados tres discos impregnados con los microorganismos de ensayo para luego ser introducidos en la nevera durante 30 minutos (T = 15°C) y después se incubaron a 37°C durante 48 hrs. La acción antagónica se evidenció por la presencia de halos de inhibición y crecimiento alrededor de los discos (Leiva et al., 2004; Mejía et al., 2007)

Capacidad de crecimiento: Las 2 mejores cepas ácido lácticas que resistieron la presencia de sales biliares y acidez fueron cultivadas en 30 ml de caldo de lactosuero e incubadas a 37°C durante 24 hrs. Se realizó una curva de crecimiento a diferentes tiempos 0, 6, 12, 18, 24 y 30 hrs. El crecimiento se comprobó mediante la determinación del número de células viables (UFC) (Laurencio et al., 2002; Rondón et al., 2008).

Fase 3. Caracterización de bacterias con potencial probiótico

Identificación molecular por PCR.

Las cepas bacterianas ácido lácticas que presentaron potencial probiótico fueron identificadas a nivel molecular por la técnica de reacción en cadena de la polimerasa – PCR, enviadas a la Corporación CorpoGen para sus respectivos análisis. La identificación molecular de aislamientos de los microorganismos incluyó los siguientes pasos (Corpogen, 2017):

- Aislamiento y purificación del DNA.
- Amplificación por PCR de la región de 1465 pb del gen ribosomal 16S.
- Purificación de los fragmentos de PCR y secuenciación con los iniciadores 27F, 518F, 800R, y 1492R del gen ribosomal 16S.

- Limpieza manual de cada una de las secuencias de los fragmentos obtenidos.
- Ensamblaje de las secuencias y obtención de la secuencia problema.
- Análisis taxonómico de la secuencia problema ensamblada, mediante la comparación contra las bases de datos NCBI (National Center for Biotechnology Information), Greengenes (Laurence Berkeley National Laboratory) y RDP (Ribosomal Database Project).
- Alineamiento y generación de un árbol de distancias utilizando las secuencias con mayor similitud a la secuencia problema.
- Clasificación taxonómica de la secuencia consenso.

Las secuencias consenso también fueron comparadas con secuencias homologas de la base de datos de GenBank. Se obtuvo el árbol de distancia que muestra la historia evolutiva de los microorganismos mediante el método de máxima similitud en el que se muestra el porcentaje en que los taxones se encuentran asociados a las ramas. Los análisis evolutivos fueron realizados en el programa bioinformático MEGA 6.

Fase 4. Diseño experimental y análisis estadístico

En la presente investigación todos los ensayos fueron montados bajo un Diseño Completo al Azar con arreglo factorial. En los experimentos o diseños factoriales los tratamientos se forman combinando los niveles de los factores en estudio, de manera que el efecto del tratamiento τ_i se considera a su vez compuesto de los efectos de los factores y sus interacciones.

Prueba de sales biliares, pH o NaCl. Diseño de tratamiento multifactorial formado por 3 factores, donde el factor A corresponde a las concentraciones de sales biliares, pH o NaCl, el factor B a la concentración del inóculo y el factor C, las cepas en estudio.

Prueba de tolerancia a cambios de temperatura y antagonismo. Diseño multifactorial formado por 2 factores, donde el factor A: patógeno o temperatura y el factor B: cepas en estudio.

El análisis de varianza se realizó para verificar diferencias significativas entre las medias, con un nivel de significancia con $\alpha = 0,05$ previa verificación de la normalidad (Prueba de Kolmogorov-Smirnov) y homogeneidad de varianza (prueba de Bartlett) y la prueba de Tukey se aplicó para realizar las comparaciones múltiples entre las medias. Los datos fueron analizados bajo el programa Statgraphics centurión VI.

Resultados y Discusión

Caracterización de bacterias y levaduras

Aislamiento de microorganismos. De los medios de cultivo Nutritivo modificado, MRS y SDA fueron aisladas 82 cepas entre bacterias (65) y levaduras (17) de las cuales solo 14 superaron las pruebas probióticas realizadas, 8 microorganismos aislados de medio MRS y 6 de SDA (tabla 1). Los primeros presentaron características macroscópicas y microscópicas de bacterias ácido lácticas – BAL. Todas las colonias presentaron morfología celular bacilos gram (+) y las mismas características morfológicas, es decir, formaciones circulares, borde entero, superficie lisa, color blanco, sin pigmentos y no formadora de esporas, de tamaño pequeñas, medianas y grandes coincidiendo con la descripción del género *Lactobacillus* indicada por Kandler & Weiss (1992).

Tabla 1. Características morfológicas de los microorganismos aislados de estiércol de terneros de levante de raza Brahman.

CEPA*	MEDIO DE CULTIVO	CARACTERÍSTICAS MACROSCÓPICAS	CARACTERÍSTICAS MICROSCÓPICAS
Mae	Agar MRS	Colonias de forma irregular color crema, borde dentado	Bacilos medianos, Gram (+)
Maf		Colonias grandes color blanco, borde entero	Bacilos delgados, Gram (+)
Mf1		Colonias pequeñas translucidas, borde entero	Bacilos delgados, Gram (+)
Maf 2		Colonias grandes, color blanco borde entero	Bacilos largos medianos, Gram (+)
ML103		Colonias pequeñas color blanco, borde entero	Bacilos medianos, Gram (+)
Ma105s	Agar SDA	Colonias pequeñas color crema, borde dentado	Bacilos medianos, Gram (+)
Maj		Colonias pequeñas, color blanco borde entero	Cocobacilos pequeños, Gram (+)
MIS3B		Colonias grandes, elevadas, brillantes, color beige crema, borde entero	Levaduras ovaladas y alargadas, presenta pseudohifas y clamidospora

CEPA*	MEDIO DE CULTIVO	CARACTERÍSTICAS MACROSCÓPICAS	CARACTERÍSTICAS MICROSCÓPICAS
MIS5°C		Colonias grandes, elevadas, brillantes, color beige crema, borde entero	Levaduras alargadas y ovaladas, presenta pseudohifas y clamidospora
MSPS3B		Colonias grandes, elevadas, brillantes, color beige crema, borde entero	Levaduras alargadas y ovaladas presenta pseudohifas y clamidospora
MIS4'A		Colonias grandes, elevadas, brillantes, color beige crema, borde entero	Levaduras ovaladas, presenta pseudohifas y clamidospora
MSPM(S)1'BR-1LEV		Colonias grandes, elevadas, brillantes, color beige crema, borde entero	Levaduras ovaladas, presenta pseudohifas y clamidospora
MIM4D		Colonias grandes, elevadas, brillantes, color beige crema, borde entero	Levaduras ovaladas, presenta pseudohifas y clamidospora

**Código de cepa aislada. Fuente: datos de la investigación*

Las levaduras aisladas de SDA presentaron características propias de la familia Candidiaceae, caracterizadas por formar sobre los medios de cultivo colonias pastosas, constituidas en su mayor parte por células aisladas que suelen ser esféricas, ovoideas, elipsoideas o alargadas. El crecimiento de estas cepas en CHROMagar fue positiva confirmando la presencia de este tipo de microorganismos que no fueron de interés en la presente investigación. Asimismo, las cepas aisladas de medio Nutritivo modificado (57) presentaron morfología celular de cocobacilos y bacilos gram (-), característico de bacterias de la familia Enterobacteriaceae, razón por la cual no se les realizó ningún tipo de análisis.

Determinación de la actividad probiótica in vitro de bacterias y levaduras.

La Tabla 2 muestra las cepas que cumplieron con las características deseadas para microorganismos probióticos, diferenciadas por presentar catalasa (-), característica general del género *Lactobacillus* concordando con De Roissart & Luquet (1994), quienes describen que las cepas lácticas carecen de la enzima. La prueba de oxidasa fue negativa para todas, mientras que en las concentraciones a sales biliares y crecimiento a diferentes pH se observó que la mayoría de las cepas evaluadas excepto Maj y Ma105s crecieron satisfactoriamente en medio MRS y en los pH de valores bajos evaluados, requisito indispensable para que se puedan incluir como probióticos en la dieta humana y animal. Con relación a la prueba de antagonismo, todos los aislados presentaron inhibición frente a los patógenos evaluados *Salmonella*, *Pseudomona*, *E. Coli*.

Tabla 2. Selección de microorganismos con características probióticas.

CEPA	MEDIO DE CULTIVO	PRUEBA DE CATALASA	PRUEBA DE OXI-DASA	PRUEBA DE SALES BILIA-RES 0,05 0,1 0,15 0,3	CRECIMIEN-TO A Ph 3,0 4,0 5,6 7,0	INHIBICIÓN DE PATÓ-GENOS
Mac	MRS	-	-	++++	++++	+
Maf	MRS	-	-	++++	++++	+
Mf1	MRS	-	-	++++	++++	+
Maf 2	MRS	-	-	++++	++++	+
ML103	MRS	-	-	++++	++++	+
Ma105s	MRS	-	-	++++	-+++	+
Maj	MRS	-	-	+++ -	-+++	+
Ma105bb	MRS	-	-	++++	+++ -	+

+ = prueba positiva, - = prueba negativa

Tolerancia a cambios de pH

El análisis de varianza realizado reveló que los valores de pH a los que fueron sometidas las cepas ácido lácticas y la interacción de estos con las mismas tuvieron un efecto altamente significativo en el crecimiento con un $p=0.0000$, indicando que el ácido afecta de manera diferente el crecimiento, dependiendo del tipo de cepa. Además, la prueba de correlación de Pearson

mostró una relación directamente proporcional del pH con relación a la variable respuesta con un valor de $r = 0.3224$, lo que significa que a medida que aumenta el valor de pH, mayor es el crecimiento de las cepas evaluadas.

La prueba de múltiples rangos de comparación de medias de Tukey señala, que a pH 5.6 las cepas evaluadas presentaron mayor número de unidades formadoras de colonia con una media de 3.1×10^8 UFC/ml (figura 1), mientras que a pH 7 el crecimiento disminuyó, pero se mantuvo estable, resultado que concuerda con Acedo y Rico (1998) quienes determinaron que las concentraciones más habituales de un microorganismo probiótico oscilan entre 10^8 y 10^{10} UFC/ml.

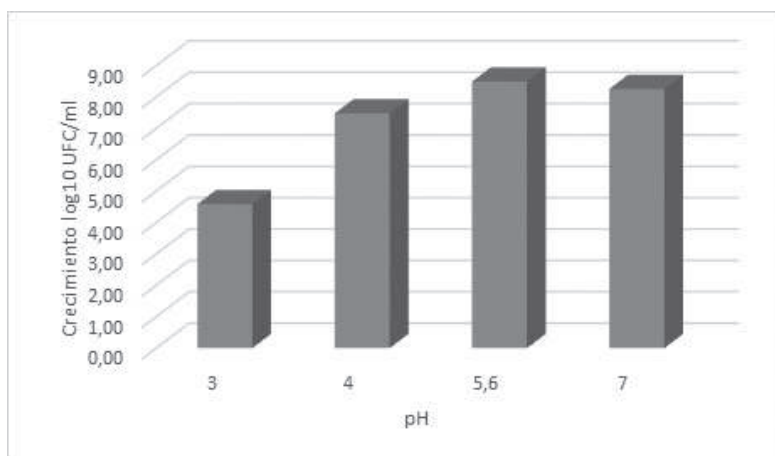


Figura 1. Tolerancia de las cepas ácido lácticas a diferentes pH.

Efectos similares reportaron Lara y Acosta (2013) quienes obtuvieron bacilos aislados del intestino de termitas con un incremento en la magnitud de su densidad poblacional de 10^8 UFC/ml en medios con pH 5 y 7, diferentes a los reportados por Lara y Burgos (2012) en donde a pH 4, se presentó el mayor porcentaje de crecimiento de las tres cepas evaluadas como aditivos en la alimentación avícola (*Saccharomyces* sp, *Bacillus* sp y *Lactobacillus* sp). Sin embargo, los resultados obtenidos en este estudio muestran que el crecimiento bacteriano no se vio afectado por los niveles de pH, dado que las bacterias siguieron desarrollándose a pH relativamente bajo, lo que favorece el proceso de fermentación debido a su capacidad de resistir la acidez que se produce en el estómago, que es uno de los principales

obstáculos para el paso del probiótico a través del tracto gastrointestinal (Jurado et al., 2014).

De las 8 cepas ácido lácticas evaluadas sólo 2 (Maj y Ma105s) no toleraron altas concentraciones de ácido (pH 3.0), evidenciado por el nulo crecimiento. La tabla 4 muestra la media de las UFC/ml de las BAL a pH 3.0 indicando que Maf (*Lactobacillus fermentum*) tuvo el mejor crecimiento a este pH durante 24 hrs. Además, la mayoría de las cepas evaluadas a pesar de su poco crecimiento a pH 3 – 4 este se mantuvo estable en este rango (anexo 4), coincidiendo con investigaciones de Du Toi et al. (1998) y Dunne et al. (2001) quienes han demostrado que las cepas de *Lactobacillus* son resistentes a pH ácido variando entre 2.5 y 4. Asimismo, Lin et al. (2007) afirman que la mayoría de las cepas de *L. fermentum* son ácidas estables debido a que los recuentos bacterianos de estas cepas cambian de manera insignificante después de 3 horas de incubación en el jugo gástrico de pH 2.6 y pH 3.2

Tabla 3. UFC/ml de bacterias ácido lácticas a pH 3.0.

Cepa	UFC/ml
Maf (<i>Lactobacillus fermentum</i>)	3.1x10 ⁵
Maf2 (<i>Lactobacillus fermentum</i>)	6.0x10 ²
Mae (<i>Lactobacillus mucosae</i>)	1.5x10 ²
Maf1 (<i>Lactobacillus johnsonii</i>)	1.3x10 ²
Ma105bb	8.0x10 ¹
ML103	7.0x10 ¹
Maj	0
Ma105s	0

Fuente: cálculos del estudio

En general *Lactobacillus fermentum* es una de las especies donde hay mayor número de reportes, encontrándose que es una de las cepas más tolerantes a la acidez gástrica con un porcentaje de supervivencia de 77.7%, luego de dos horas de incubación (Cueto et al., 2010) y superior al 90% después de tres y cuatro horas de incubación a pH 3 (Mahmoudi et al., 2016). Bao et al. (2010) también reportaron 11 cepas de *L. fermentum*

con alta tolerancia a la acidez gástrica y con un porcentaje de supervivencia del 80% luego de 3 horas de incubación a pH 2.5.

Con relación a las cepas *Lactobacillus mucosae* y *Lactobacillus johnsonii* estas mostraron una disminución en la supervivencia a pH 3. Sin embargo, a pH 7 presentaron un incremento significativo de la población; resultados similares reportó De Angelis et al. (2006) quienes observaron que *L. mucosae* mostraba disminución en la supervivencia después de 3 horas de incubación en jugo gástrico simulado a pH 3 pero a pH 8 presentaba mayor número de colonias. Asimismo, Cho et al. (2000) encontraron que *L. johnsonii* sobrevivió a pH 3 al menos 3 horas.

Los resultados obtenidos demostraron la capacidad de las cepas para sobrevivir en condiciones drásticas de acidez a pesar de que a este valor de pH 3 el crecimiento disminuyó. Este hallazgo de que las cepas evaluadas en el presente estudio toleren este pH durante 24 horas es interesante debido a que existen reportes que indican que otras cepas de lactobacilos como la M92 de *Lactobacillus acidophilus* solo puede sobrevivir durante 3 hrs a este pH, produciéndose luego la lisis del 60% de la población inicial (Suskovic et al., 1997).

Tolerancia a sales biliares

Los resultados obtenidos para sales biliares indicaron que todas las especies de lactobacilos fueron capaces de sobrevivir a las concentraciones de sales biliares ex-perimentadas (0.05% (p/v) a 0.3% (p/v). El análisis de varianza mostró estadísticamente un efecto significativo entre la interacción cepas - concentraciones de sales y el crecimiento con un $p= 0.0000$. Además, la prueba de múltiples rangos de comparación de medias de Tukey señala que hubo mayores unidades formadoras de colonia de las bacterias seleccionadas a la concentración de sales biliares de 0.05% 1.1×10^9 UFC/ml, lo que indica que la presencia de las diferentes concentraciones de las sales no afecta el crecimiento de la cepa, pero si su porcentaje de supervivencia siendo en su mayoría más tolerantes a la presencia de esta concentración (figura 2). Además, la prueba de correlación de Pearson señala que las variaciones observadas revelan un comportamiento inversamente proporcional entre el crecimiento de las bacterias y las concentraciones de sales ($r= -0.3434$), indicando que a mayor concentración de sales biliares menor es la población de BAL.

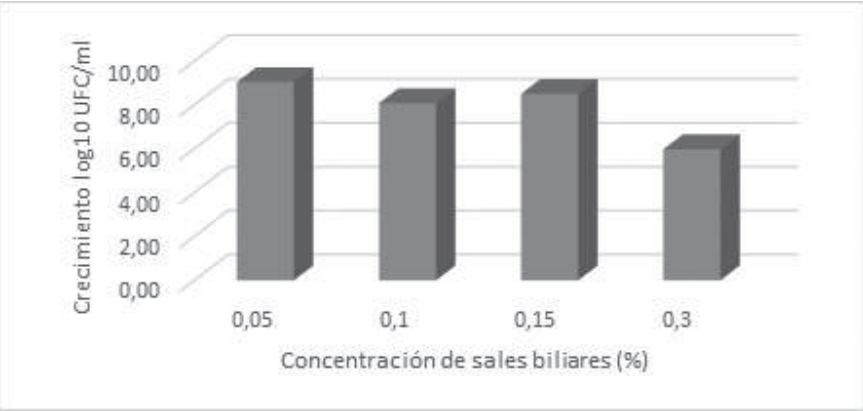


Figura 2. Tolerancia de las cepas ácido lácticas a sales biliares (%).

En todos los ensayos de este estudio se alcanzaron densidades poblacionales mayores a 10^8 UFC/ml excepto a la concentración de 0.3%, encontrándose dentro de los valores establecidos para microorganismos probióticos (Acedo y Rico, 1998); a diferencia de estudios realizados por Lara y Acosta (2013) quienes demostraron incrementos significativos en la concentración de UFC/ml después de 24 horas de incubación pasando de una densidad de 10^7 a 10^8 UFC/ml en todas las concentraciones de sales evaluadas (0.00%, 0.05%, 0.15%, 0.30%).

La Tabla 4 señala que *Lactobacillus mucosae* fue la que tuvo mayor densidad poblacional a la concentración de 0.3% coincidiendo con resultados de Valeriano et al. (2014) que indicaron que la cepa *L. mucosae* LM1 podría sobrevivir a una concentración de sal biliar de 0.3%.

Tabla 4. UFC/ml de bacterias ácido lácticas a 0.3% de sales biliares.

Cepa	UFC/ml
<i>Lactobacillus mucosae</i>	6.6×10^6
<i>Lactobacillus fermentum</i>	4.9×10^5
ML103	3.3×10^5
<i>Lactobacillus fermentum</i>	3.8×10^4
Ma105s	1.7×10^2

<i>Lactobacillus johnsonii</i>	8.0x10 ¹
Ma105bb	3.3x10 ¹
Maj	0

Fuente: cálculos del estudio

Lactobacillus fermentum también mostró tolerancia a esta baja concentración de sales, pero en menor cantidad de unidades formadoras de colonia, resultados que conciertan con los estudios realizados por Lin et al. (2007) que mostraron que las cepas de *L. fermentum* en la evaluación de su tolerancia a la bilis (0.3) después de 4 hrs de incubación fueron resistentes en un 100% encontrándose en la fase de crecimiento logarítmico medida por valores de DO a 620 nm. A pesar de su baja densidad poblacional *Lactobacillus johnsonii* también pudo resistir la concentración de sal biliar de 0.3%. Cho et al. (2000) observó en su estudio que *L. johnsonii* fue relativamente resistente a la sal biliar 0.3.

Tolerancia a diferentes temperaturas

El análisis de varianza mostró que las temperaturas evaluadas (30, 40°C) tienen un efecto estadísticamente significativo en el crecimiento de las bacterias ácido lácticas con un $p=0.0000$, lo que demuestra termotolerancia de las cepas a dichas temperaturas sin afectar su crecimiento. La prueba de múltiple rangos indica que a una temperatura de 40°C las cepas presentan un mayor número de unidades formadoras de colonias (3.1x10⁸ UFC/ml) y no afecta su crecimiento como se muestra en la figura 3, resultados que coinciden con lo observado por Mora y García (2007), quienes mencionan que los *Lactobacillus* pueden desarrollarse con límites de temperatura que oscilan entre 2 y 52°C, siendo su rango óptimo de crecimiento entre 30 a 40°C, característica importante de las bacterias puesto que les permite crecer en diferentes temperaturas.

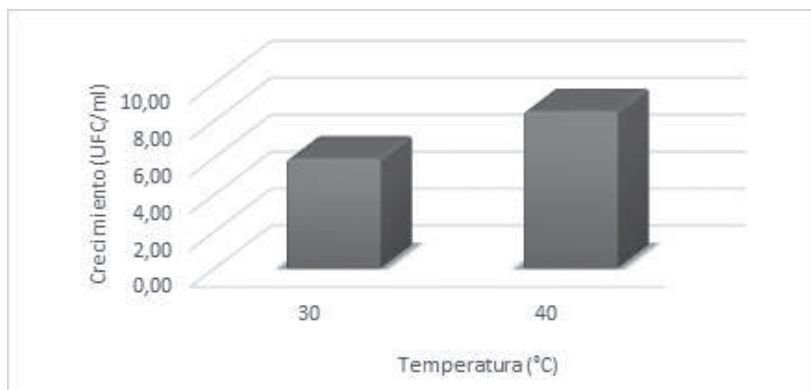


Figura 3. Tolerancia de las cepas ácido lácticas a cambios de temperatura (°C).

La figura 4 muestra que *Lactobacillus fermentum* fue la que tuvo mejor comportamiento a 40°C frente a la variable respuesta, con una media de 1.4×10^9 UFC/ml, seguido por *Lactobacillus mucosae* con un valor de 5.0×10^8 UFC/ml, indicando con ello que estas bacterias no son susceptibles a las variaciones de temperatura en este rango y que tienen capacidad de crecer en cantidades adecuadas (10⁸ UFC/ml), a temperaturas relativamente altas como las encontradas en el rumen (38° y 42° C) (Van Lier, 2009). Estudios realizados por De Angelis et al. (2006) han confirmado en *L. mucosae* resistencia a temperaturas de 70°C durante 10 s, encontrando una alta supervivencia celular en esta especie ($9.35 \log \text{UFC ml}^{-1}$).

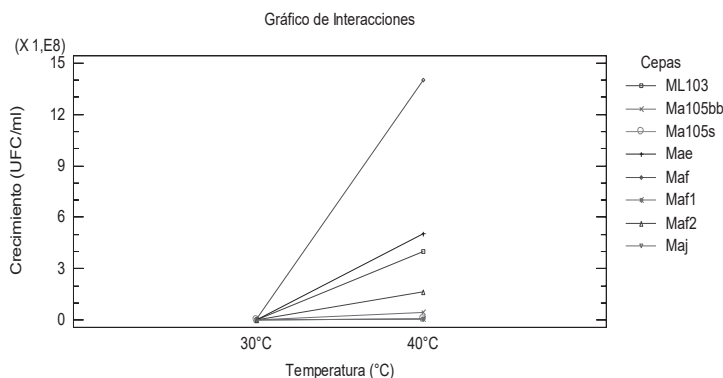


Figura 4. Interacción entre cepa – temperatura en el crecimiento de las cepas ácido lácticas (Mae= *L. mucosae*, Maf= *L. fermentum*, Maf1= *L. johnsonii* Maf2= *L. fermentum*).

Tolerancia a diferentes concentraciones de NaCl

El análisis de varianza realizado para el crecimiento arrojó diferencias significativas entre las concentraciones de sales evaluadas con un $p=0.0000$, siendo notable al 2% (0.99) y 4% (0.27) y muy bajo al 7% (0.07) y 10% (0.04) p/v de NaCl como lo mostró la prueba de Tukey, indicando que el crecimiento está determinado por el tipo de bacteria y la respectiva concentración de NaCl a la que fue sometida. Asimismo, la prueba de Pearson mostró que este fue inversamente proporcional a la concentración de NaCl con un valor de $r= -0.6037$, reflejando que a medida que aumenta la concentración de sales el crecimiento va disminuyendo notablemente (figura 5).

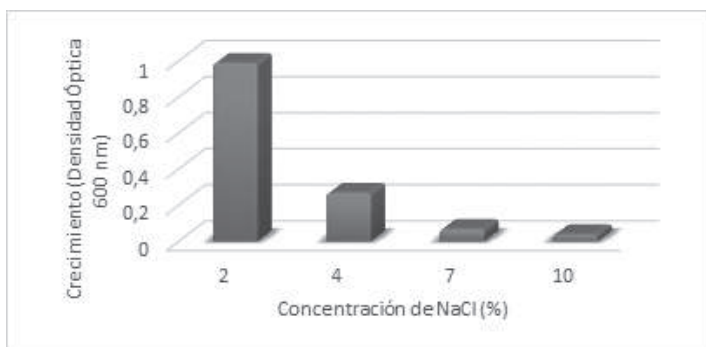


Figura 5. Tolerancia de las cepas ácido lácticas a diferentes concentraciones de NaCl.

En la Tabla 5 se describen las cepas ácido lácticas que tuvieron mayor crecimiento a altas concentraciones de NaCl siendo *Lactobacillus fermentum* la más considerable.

Tabla 5. UFC/ml de cepas ácido lácticas a concentración de NaCl 10%

Cepa	DO (600 nm)
<i>Lactobacillus fermentum</i>	0.08
ML103	0.06
<i>Lactobacillus mucosae</i>	0.04
<i>Lactobacillus fermentum</i>	0.04
Maj	0.04
<i>Lactobacillus johnsonii</i>	0.03
Ma105bb	0.02
Ma105s	0.01

Fuente: cálculos del estudio

Los resultados en este estudio también fueron similares a los obtenidos por Lara y Burgos (2012) quienes comprobaron que efectivamente el crecimiento de los microorganismos evaluados fue también mayor en 2 y 4% de NaCl.

Fermentación de la glucosa

La figura 6 muestra que la producción de gas fue negativa solo para *Lactobacillus johnsonii* y Ma105bb, las demás produjeron gas. Estas cepas que fermentaron la glucosa sin producción de gas durante las 24 hrs de in-cubación demostraron una asimilación del carbohidrato lo que evidencia la ruta metabólica homofermentativa utilizada por el género *Lactobacillus* sp., indicando la producción de ácido láctico (Lara y Burgos, 2012); resultados que coinciden con Taheri et al. (2009) quienes asegura que *L. johnsonii* pertenece al grupo de las bacterias homofermentativas obligadas.

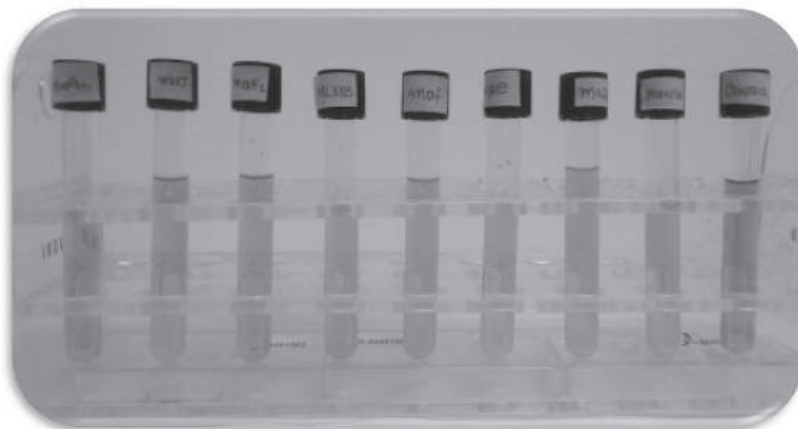


Figura 6. Capacidad de fermentación de la glucosa por las cepas ácido lácticas en solución de púrpura de bromocresol (0,5%) y campanas de Durham.

Según Díaz et al. (2014) *L. fermentum* presenta un tipo de metabolismo heterofermentativo obligado. Asimismo, Soriano et al. (2014) señaló que *L. mucosae* es conocida por ser heterofermentativa coincidiendo con los resultados obtenidos en este ensayo. De igual forma, Mamuad et al., (2012) también indicó que los resultados obtenidos durante la caracterización de los metabolitos y la producción de gas de *L. mucosae* demostraron que esta bacteria es capaz de producir CO₂ y H₂ cuando se cultiva en medio MRS, básicamente como productos de la fermentación anaeróbica de la glucosa contenida en el medio.

Prueba de antagonismo

El ensayo de inhibición in vitro mostró que todas las cepas de *Lactobacillus* sp., fueron capaces de ejercer un efecto inhibitorio contra los 3 patógenos (*Salmonella*, *Pseudomonas aureginosa*, *Escherichia Coli*) con halos entre 0.8 y 1 mm de distancia, que son independientes de la cantidad de discos manejados en agar. El análisis de varianza realizado para el crecimiento mostró estadísticamente diferencias significativas entre las cepas y los patógenos evaluados con un $p= 0.000$. La prueba de Tukey señaló que *E. Coli* fue el patógeno mayormente inhibido por las cepas con una media de 1 mm, seguido por *Salmonella* (0.9 mm) y finalmente *P. aureginosa* con un valor de 0.8 mm (figura 7), coincidiendo con Mahmoudi

et al. (2016) quienes demostraron que tanto la cepa *L. fermentum* B116 como B19 mostraron las mayores capacidades de inhibición contra *E. Coli* ($d = 10^7$ pm 0.47 mm y 9×10^6 pm 0.39 mm, respectivamente).

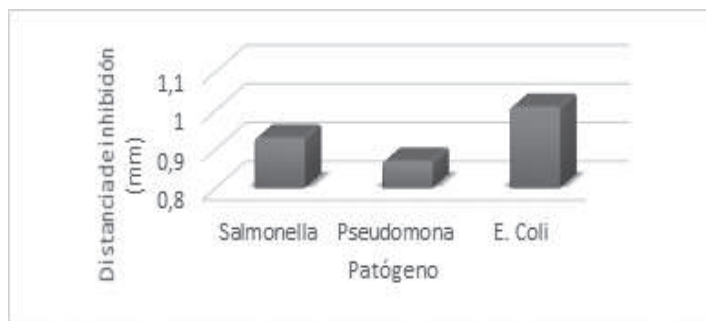


Figura 7. Halos de inhibición producido por las cepas ácido lácticas.

En este ensayo se observó que las colonias de bacterias inhibieron el crecimiento de los patógenos evaluados en una baja proporción, debido a que presentaron halos alrededor de los discos de papel filtro que no superaron los 2 mm, resultados similares a los obtenidos por Lara y Burgos (2012) quienes demostraron en su estudio que *Lactobacillus* sp., también produjo halos de inhibición de 1mm frente a *Salmonella* y *E. Coli*.

En la figura 8 se observa que las cepas que tuvieron mejor inhibición frente a los patógenos fueron: Ma105s (1.2 mm) y Maf2 - *L. fermentum* - (1.1 mm) frente a *E. Coli*, Maf1 - *L. johnsonii* (1.2 mm) y Ma105bb (0.9) frente a *P. aureginosa* Maf1 - *L. johnsonii* (0.9) y Ma105s (0.9) frente a *Salmonella*. Estos resultados están de acuerdo con Lin et al., (2007) quienes señalan que la mayoría de las cepas de *L. fermentum* son inhibidoras de bacterias patógenas Gram-negativas, tales como *E. coli*, *Salmonella* spp., *Shigella* spp., y bacterias Gram-positivas, como *S. aureus* enterotoxigénicos aunque las amplitudes inhibitorias son variables. Asimismo, Mahmoudi et al. (2016) comprobaron que tanto la cepa *L. fermentum* B116 como B19 mostraron las mayores capacidades de inhibición contra *E. Coli* ($d = 10^7$ pm 0.47 mm y 9×10^6 pm 0.39 mm, respectivamente).

Valeriano et al., (2014) también han demostrado que *L. mucosae* (LM1) aislada recientemente de las heces de lechones era capaz de producir una bacteriocina putativa que ejercía un efecto inhibitor sobre

el crecimiento de *Escherichia coli* K88 y *Salmonella typhimurium* KCCM 40253.

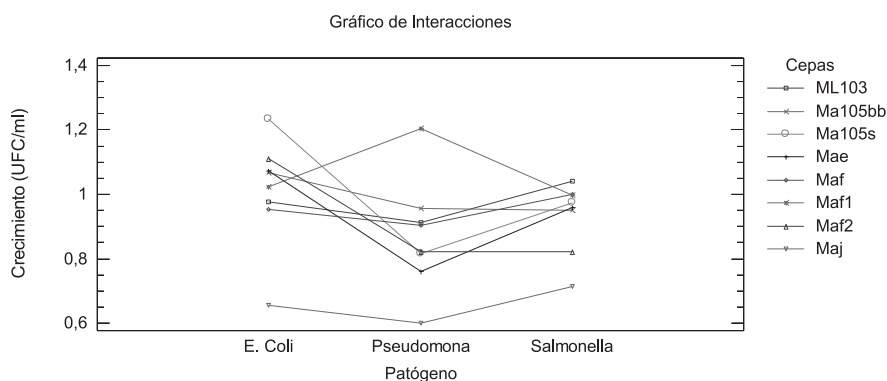


Figura 8. Interacción de cepas – patógenos en la producción de halos de inhibición por las cepas en estudio (Mae= *L. mucosae*, Maf= *L. fermentum*, Maf1= *L. johnsonii* Maf2= *L. fermentum*).

Este proceso de inhibición probablemente se deba a la producción de sustancias como resultado de la fermentación, principalmente la generación de compuestos antimicrobianos, tales como los ácidos lácticos, acético y propiónico, el peróxido de hidrógeno (H_2O_2), la reuterina, el dióxido de carbono (CO_2), el diacetilo (2,3-butanodiona), el acetaldehído y compuestos de alto peso molecular como las bacteriocinas, característico del metabolismo de las bacterias lácticas (Ramírez, 2005). De hecho, uno de los más importantes mecanismos por el cual las BAL inhiben a sus competidores se da por la producción de ácido láctico, acético y bacteriocinas, metabolitos antimicrobianos que pueden ser beneficiosos para la conservación de los alimentos (Dunne et al., 2001; Bernet-Camard et al., 1997). Barrow et al., (1980) señalaron que el crecimiento de la mayoría de los microorganismos, como las bacterias coliformes, podría ser inhibido cuando el pH del medio era inferior a 4.5 y las cepas de este estudio toleraron valores de pH inferiores a este, dato importante para considerarse como bacterias con potencial probiótico.

Capacidad de crecimiento

En la figura 9 se muestra el crecimiento de la cepa Mae (*Lactobacillus mucosae*) y Maf (*Lactobacillus fermentum*) en medio de cultivo de lactosuero. La fase exponencial se alcanzó primero en *L. mucosae* a las 6 hrs (tiempo 2) con un valor de 5.8×10^7 UFC/ml, mientras que *L. fermentum* tuvo mayor cantidad de unidades formadoras de colonia a las 12 hrs (tiempo 3), con un valor de 1.5×10^8 UFC/ml, resultados que coinciden con los reportados por Jurado et al. (2014) donde *L. plantarum* también tuvo su crecimiento máximo a las 12 hrs con un valor de 6.75×10^{12} UFC/ml, lo que indica que ese es el tiempo mínimo de duración del proceso fermentativo. Además, estos valores estarían relacionados con los reportados por Acedo y Rico (1998) quienes afirman que las concentraciones más frecuentes de un microorganismo probiótico oscilan entre 10^8 y 10^{10} UFC/ml.

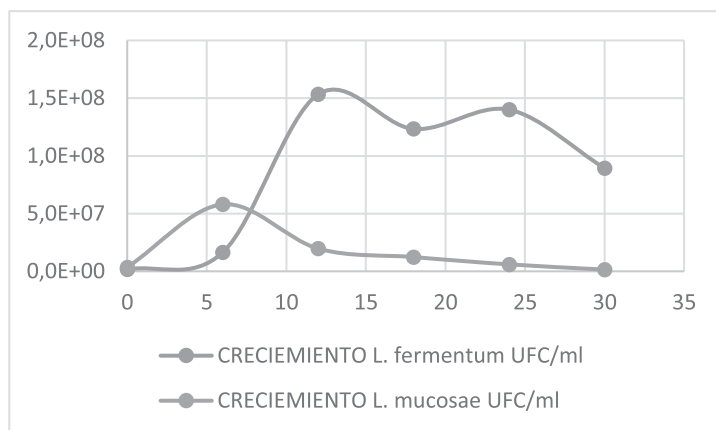


Figura 9. Curva de crecimiento de *Lactobacillus mucosae* y *Lactobacillus fermentum* en medio de lactosuero.

En ese sentido, *Lactobacillus fermentum* puede ser un microorganismo óptimo para ser utilizado en la preparación de inóculos, por cuanto a las 12 horas la bacteria alcanza la fase exponencial de crecimiento, disponiendo de una concentración celular suficiente para mantener una viabilidad alta en el tiempo. Además, tratándose de su crecimiento en un medio de cultivo de lactosuero que desde el punto de vista económico es una materia prima barata, asequible y lo más importante proporciona los nutrientes necesarios

para el crecimiento de bacterias lácticas, lo que permitiría la producción de inóculos con propiedades probióticas para futuros estudios en animales in vivo, debido a que los costos de producción del medio serían de gran interés siendo factible el proceso de producción a nivel industrial de estos inóculos para este tipo de microorganismos.

Identificación molecular por PCR

La identificación de bacterias probióticas a través de la secuenciación 16S rRNA es una técnica adecuada y accesible (FAO / OMS, 2002). En el presente estudio la base de datos de secuencias tipo del algoritmo Seqmatch-RDP contra aislamientos cultivados indicó que las secuencias problemas ensambladas fueron muy similares en la mayoría de sus longitudes con las cepas tipo identificadas como: *Lactobacillus fermentum* (Maf – Maf2), *Lactobacillus mucosae* (Mae) y *Lactobacillus johnsonii* (Maf1).

Los resultados del análisis taxonómico dan prueba de ello demostrando que la secuencia ensamblada de 1502 pb contra la base de datos refseq/rRNA del NCBI, indicó que tiene un 99% de identidad en el 99% de su longitud, con secuencias del gen ribosomal 16S pertenecientes a *Lactobacillus fermentum* (Maf – Maf2). Asimismo, la secuencia ensamblada de 1495 pb contra la misma base de datos, indicó que tiene un 100% de identidad en el 100% de su longitud, con secuencias del gen ribosomal 16S pertenecientes a *Lactobacillus mucosae* (Mae). Finalmente, la secuencia ensamblada de 1493 pb también, indicó que tiene un 99% de identidad en el 100% de su longitud, con secuencias del gen ribosomal 16S pertenecientes a *Lactobacillus johnsonii* (Maf1) (CorpoGen, 2017).

De otra parte, las secuencias en estudio también fueron comparadas con secuencias homologas de la base de datos de GenBank mostrando que efectivamente las secuencias estudiadas son muy similares a secuencias de *Lactobacillus fermentum*, *Lactobacillus mucosae* y *Lactobacillus johnsonii* con un 99% de identidad y 100% de cobertura (anexo 16). El árbol de distancia muestra que las secuencias estudiadas con un soporte de ramas del 100% se agrupan con las respectivas especies, demostrando que las tres cepas aisladas están asociadas a un mismo grupo perteneciente al género *Lactobacillus*. Además, se observa que la cepa Maf y Maf2 estan relacionadas en un 99% correspondiendo a la misma especie *Lactobacillus fermentum* (figura 10).

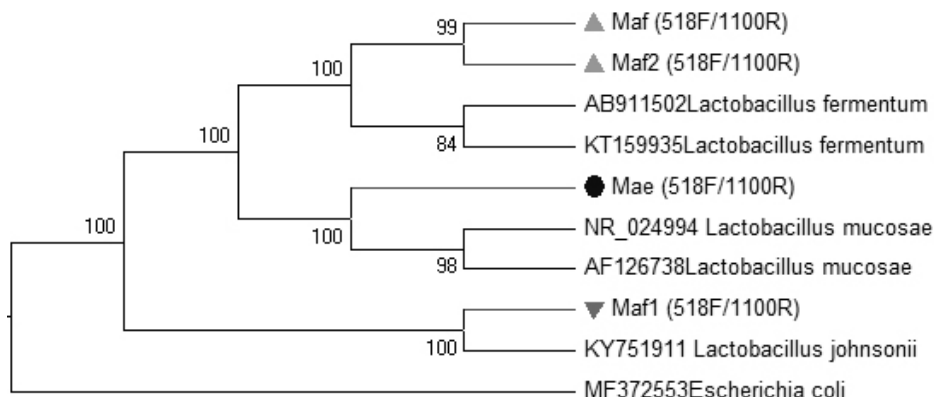


Figura 10. Árbol de distancias de las secuencias en estudio a partir de la base de datos GenBank.

Conclusiones

Las cepas aisladas demostraron su potencial como probióticos en condiciones in vitro con una adecuada formación de biomasa para la producción de inóculo, razón por la cual estas bacterias obtenidas podrían ser utilizadas como aditivos en alimentos para humanos o animales; siendo *Lactobacillus fermentum* (Maf – Maf2) y *Lactobacillus mucosae* (Mae) las que presentaron mayor viabilidad como probióticos, por lo que podrían ser una alternativa factible para sustituir las terapias con antibióticos.

Referencias Bibliográficas

- Acedo, J. y Rico, G. 1998. Utilización de aditivos en piensos para rumiantes: minerales forma orgánica, levaduras, enzimas, ionóforos y otros. Disponible en: www.produccion-animal.com.ar.
- Armstrong, J.D., Kraeling, R.R. y Britt, J.H. (1988). Effects of naloxone or transient weaning on secretion of LH and prolactin in lactating sows. *Journal of Reproduction and Fertility*, 83, 301-30.
- Ávila, J., Ávila, M., Tovar, B., Brizuela, M., Perazzo, y., Hernández, H. (2010). Capacidad probiótica de cepas del género *Lactobacillus* extraídas del tracto intestinal de animales de granja. *Revista Científica Universidad de Zulia-Venezuela*, 20(2):161-169.

- Bernet-Camard, M-F., Liévin, V., Brassart, D., Neeser, J.-R., Servin, A.L. y Hudault, S. (1997). The human *Lactobacillus acidophilus* strain Lal secretes a non bacteriocin antibacterial substance active in vitro and in vivo. *Appl. Environ. Microbiol.*, 63, 2747–2753.
- Brizuela, M. (2003). Selección de cepas de bacterias ácido lácticas para la obtención de un preparado con propiedades probióticas y su evaluación en cerdos. Tesis Doctoral. ICIDCA, Cuba. p.101.
- CORPOICA - INCODER. (2005). Zonificación agroecológica y evaluación económica de sistemas de producción prioritarios en el área de desarrollo rural Sabanas de Sucre. Bogotá.
- Corporación Corpogen (2017). Investigación y Biotecnología.
- Cueva, D.F. (2014). Efecto de dos aditivos prebióticos y probióticos en el crecimiento y condición corporal en terneras Holstein friesian, Tumbaco, Pichincha. Quito – Ecuador.
- Cho, J. S., Choi, Y. J., y Chung, D. K. (2000). Expression of *Clostridium thermocellum* endoglucanase gene in *Lactobacillus gasseri* and *Lactobacillus johnsonii* and characterization of the genetically modified probiotic lactobacilli. *Current microbiology*, 40(4), 257-263.
- De Angelis, M., Siragusa, S., Berloco, M., Caputo, L., Settanni, L., Alfonsi, G. y Gobbetti, M. (2006). Selection of potential probiotic lactobacilli from pig feces to be used as additives in pelleted feeding. *Research in Microbiology*, 157(8), 792-801.
- Departamento Administrativo Nacional de Estadísticas, DANE (2011). Cuentas Nacionales. Recuperado en diciembre de 2012 de http://www.dane.gov.co/index.php?option=com_content&view=article&id=127&Itemid=84.
- Du Toi, M., Franz, C.M.A.P., Dicks, L.M.T., Schillinger, U., Haberer, P., Warlies, B., Ahrens, F., y Holzapfel, W.H. (1998). Characterisation and selection of probiotic Lactobacilli for a preliminary minipig feeding trial and their effect on serum cholesterol levels, faeces pH and faeces moisture content. *Inter. J. Food Microbiol.* 40, 93-104.
- Dunne, C., O'Mahony, L., Murphy, L., Thornton, G., Morrissey, D., O'Halloran, S., Feeney, M., Flynn, S., Fitzgerald, G., Daly, C., Kiely, B., O'Sullivan, G. C., Shanahan, F., Collins, J. K. (2001). In vitro selec-

- tion criteria for probiotic bacteria of human origin: correlation with in vivo findings. *American J of Clin Nutr.* 73: 386-392S
- Federación Colombiana de Ganaderos FEDEGAN. (2000). *Manual Práctico del Ganadero.* 45p.
- Federación Colombiana de Ganaderos FEDEGAN (2011). *La Ganadería Colombiana y las Cadenas Láctea y Cárnica – Actualización cifras de referencia PEGA 2019.* Bogotá.
- Federación Colombiana de Ganaderos FEDEGAN. (2014). *Plan de desarrollo ganadero 2014 – 2019.* Bogotá. ISBN: 978-958-8498-73-7.
- Freitas, M., Tavan, E., Cayuela, C. y cols. (2003). Host-pathogens cross-talk. Indigenous bacteria and probiotics also play the game. *Biol Cell*, 95, 503-506.
- Gaggia, F., Mattarelli, P., & Biavati, B. (2010). Probiotics and prebiotics in animal feeding for safe food production. *Intern J of Food Microbiol.* 141, S15–S28.
- Gutiérrez, L., Montoya, O., y Vélez, J. (2013). Probióticos: una alternativa de producción limpia y de remplazo a los antibióticos promotores de crecimiento en la alimentación animal. Artículo de revisión. *Producción + Limpia* -. Vol.8, No.1 - 135●146.
- Lara Mantilla, C., y Acosta Pineda, R.C. (2013). Bacterias celulolíticas aisladas del intestino de termitas (*Nasutitermes nigriceps*) con características probióticas y potencial en la degradación del pasto. *Revista Colombiana de Biotecnología*, 15(1).
- Lara, C. y Burgos, A. (2012). Potencial probiótico de cepas nativas para uso como aditivos en la alimentación avícola. *Revista Colombiana de Biotecnología*, 14(1), 31-40.
- Lin, W. H., Yu, B., Jang, S. H., y Tsen, H. Y. (2007). Different probiotic properties for *Lactobacillus fermentum* strains isolated from swine and poultry. *Anaerobe*, 13(3), 107-113.
- Linton, A.H., Hedges, A.J., y Bennet, B. M. (1988). Monitoring of resistance during the use of olaquinox as a feed additive on commercial pig farms. *J. Appl. Bact.* 64, 311.
- Mahmoudi, I., Moussa, O. B., Khaldi, T. E. M., Kebouchi, M., Soligot, C., Le Roux, Y., y Hassouna, M. (2016). Functional in vitro screening of *Lactobacillus* strains isolated from Tunisian camel raw milk

- toward their selection as probiotic. *Small Ruminant Research*, 137, 91-98.
- Mora, N., y García, A. (2007). Susceptibilidad de bacterias ácido lácticas (BAL) frente a diversos antibióticos. [Tesis Licenciado Química en Alimentos]. [Hidalgo, México] Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo.
- Parker, D.S., & Armstrong, D.G. (1987). Antibiotic feed additives and livestock reduction. *Proc. Nutr. Soc.* 46, 415.
- Soriano, A. P., Mamuad, L. L., Kim, S. H., Choi, Y. J., Jeong, C. D., Bae, G. S., y Lee, S. S. (2014). Effect of *Lactobacillus mucosae* on in vitro rumen fermentation characteristics of dried brewers grain, methane production and bacterial diversity. *Asian-Australasian journal of animal sciences*, 27(11), 1562.
- Soto, L.P., Frizzo, L.S., Avataneo, E., Zbrun, M.V., Bertozzi, E., Sequeira, G., Signorini, M.L., y Rosmini, M.R. (2011). Design of macrocapsules to improve bacterial viability and supplementation with a probiotic for young calves. *Anim. Feed Sci. Technol.* 165, 176- 183.
- Suskovic, J., Brkic, B., Maticic, S., Maric, V. (1997). *Lactobacillus acidophilus* M92 as potential probiotic strain *Milchwissenschaft* 52: 430 - 435.
- Taborda, J. (2011). Acompañamiento en el mejoramiento y calidad de la leche y en el proceso de certificación de hatos lecheros. (Documento en línea). Latacunga, EC. Consultado el 10 de Sep del 2013.
- Taheri, H., Tabandeh, F., Moravej, H., Zaghari, M., Shivazad, M., y Shariati, P. (2009). Potential probiotic of *Lactobacillus johnsonii* LT171 for chicken nutrition. *African Journal of Biotechnology*, 8(21).
- Torres, C., Reguera, J.A. San Martín, M.J., Pérez-Díaz, J.C., y Baquero F. (2002). Van A-mediated vancomycin-resistant *Enterococcus* spp. In sewage. *J Antimicrob Chemother*, 33, 553-561.
- Valeriano, V. D., Parungao-Balolong, M. M., y Kang, D. K. (2014). In vitro evaluation of the mucin-adhesion ability and probiotic potential of *Lactobacillus mucosae* LM1. *Journal of applied microbiology*, 117(2), 485-497.
- Van Lier, 2009. Ecosistema ruminal. Disponible en <http://cursoafa2009.webs.com/Ecosistema-Reticulo-Ruminal-2009.pdf>.

- Villena, F., y Jiménez, J. (2002). Técnico en ganadería. Madrid, ES. Editorial Cultural. p. 1- 46-70.
- Wallace, R. (1992). Rumen microbiology, biotechnology and ruminant nutrition: the application of research findings to a complex microbial ecosystem. FEMS Microbiol. Lett.100: 529.
- Wannaprasat, W., Koowatananukul, C., Ekkapobyotin, C., y Chuanchuen, R., (2009). Qualityanalysis of commercial probiotic products for food animals. Southeast Asian J. of Tropical Med. and Pub. Health 40, 1103–1112.

CAPÍTULO 11

CARACTERIZACIÓN DE BACTERIAS NATIVAS CON POTENCIAL BIOFERTILIZANTE AISLADAS DE SUELOS DEL DEPARTAMENTO DE SUCRE

Liseth Paola Pérez Flórez
Luis Eliecer Oviedo Zumaque

28 Bióloga. Maestría en Biotecnología.

29 Licenciado en biología y química, Ingeniero Agrónomo. Especialidad en Suelos y Aguas.

Introducción

La utilización de fertilizantes químicos ha sido el recurso más empleado para aumentar la producción de los cultivos. En Colombia el incremento en el uso de fertilizantes durante las últimas décadas ha dado origen a procesos de transformación en el ambiente, produciendo alteraciones físico-químicas y biológicas, lo cual ha influido en la desestabilización ecológica del suelo afectando negativamente su fertilidad (Morales, 2007). La producción de fertilizantes, conlleva a la emisión de gases efecto invernadero y los fertilizantes nitrogenados, una vez aplicados sobre los cultivos son una de las mayores fuentes de emisión de dichos gases (Rufina, 2012). Además, la roca fosfórica, materia prima de los fertilizantes fosforados tiene grandes cantidades de cadmio, este se acumula en el suelo con posterior paso a las plantas y a los animales presentando efectos tóxicos (Bonomelli et al., 2002). A esto se le suma, que estos fertilizantes son usados de forma ineficiente por las plantas (50% -60%), y el no recuperado por el cultivo termina en el medio ambiente, en su mayoría en las aguas superficiales o subterráneas ocasionando pérdida de la flora y fauna de estos ecosistemas debido a procesos de eutrofización (Lara y Oviedo, 2008) y pueden posteriormente generar lluvia acida (Armenta et al., 2010).

Desde el punto de vista económico, la fertilización química demanda altos costos ya que estos productos son elaborados con algunos insumos importados o provenientes de yacimientos mineros no renovables, adicionalmente después de su producción se adicionan los costos de transporte y mano de obra para su aplicación (Morales, 2007).

No es oculto que las exigencias del mercado global están aumentando de manera desmedida los niveles de productividad. La FAO (2011), proyecta para el 2018 la utilización de alrededor de 200 millones de toneladas de fertilizantes químicos (N, P y K₂O), destacándose Latinoamérica con un aumento del 3,3 % anual lo que genera preocupación y enciende las

alarmas por los daños adicionales que se pueden causar al medio ambiente y en especial a los suelos que son de uso para los cultivos. Según la IFA (2011), 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. Y también 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 departamento de Sucre es un eslabón importante donde la agricultura y la ganadería extensiva tienen gran acogida y en el que también se ha dado un uso indiscriminado de agroquímicos en la ejecución de dichas actividades (Gobernación de Sucre, 2016). Tiene una extensión de 87.855 ha destinada a la producción agrícola (DANE- ENA 2013) y se destacan los cultivos de yuca, arroz seco mecanizado, arroz mecano manual, maíz tradicional, maíz tecnificado, sorgo, tabaco negro, algodón, ajonjolí y ñame (BANCO DE LA REPÚBLICA, 2016).

Según el IDEAM (2015) Sucre está dentro de los departamentos con magnitud de erosión del 75,1 % respecto a su área, es decir mayor magnitud de degradación por erosión. Las actividades y factores socioeconómicos, que mayor presión ejercen sobre los suelos y ocasionan degradación por erosión, se localizan entre otros, en los territorios agropecuarios (agrícolas 92,9%, agropecuario 88.2%, ganaderos 77,3%). El uso excesivo de riego y fertilizantes en los suelos destinados para cultivos producen salinización, acidificación y contaminación dando origen a una degradación química del suelo.

Por todo lo dicho, los retos más importantes en la actualidad tiene que ver con el desarrollo de prácticas agrícolas basados en tecnologías limpias y una herramienta factible para ello es el desarrollo de planes de fertilización microbiana de modo que se minimicen los impactos negativos producidos.

El suelo es un ecosistema de enorme riqueza microbiana, los estudios sobre estos son numerosos y han permitido determinar que el empleo de microorganismos fijadores asimbióticos de nitrógeno y secretores de sustancias promotoras de crecimiento vegetal demuestran un aumento significativo en los rendimientos de cultivos y disminución de la contaminación ambiental. Dentro de los géneros más importantes en estos procesos están *Azospirillum* spp, *Rhizobium* spp, *Bacillus* spp,

Azotobacterspp. (Lara y Oviedo, 2008) *Pseudomonas sp.*, *Enterobacterspy* *Klebsiellasp* (Martínez, 1999).

La utilización de microorganismos benéficos en la agricultura ha aumentado considerablemente en los últimos años, estableciéndose como una estrategia que responde al fortalecimiento de sistemas de producción sostenible, basado en la obtención de alimentos sin, o casi nula aplicación de fertilizantes químicos y pesticidas, sin influir en la contaminación ambiental ni en la salud humana (Alarcón y Ferrera, 2000). Morales (2007) afirma que estos biofertilizantes tienen un costo para el productor equivalente al 10% del costo total de la fertilización química. Por otro lado, mientras que en el uso del fertilizante químico se aplican cientos de kilogramos por hectárea, con el uso de biofertilizantes éste se reduce a una aplicación de 1,5kg por hectárea. De acuerdo con lo planteado, el desafío actual sugiere el abandono de prácticas tradicionales poco racionales y contaminantes para reemplazarlas por otras quegaranticen la intensificación sostenible de la producción agrícola respondiendo así a la demanda cada vez mayor de alimentos para toda la población mundial y a la conservación de recursos naturales fundamentales como agua y aire.

Para el departamento de Sucre han sido pocos los estudios que se han llevado a cabo sobre dicho tema por lo que se debe dar continuidad en la búsqueda, identificación y caracterización de cepas nativas (microorganismos adaptados a las condiciones ambientales de la región) con potencial de biofertilización. Los resultados aquí hallados permitirán ofrecer nuevas alternativas tecnológicas, innovadoras y sustentables a los agricultores locales.

Es por esto, que en la presente investigación se caracterizaron bacterias nativas con potencial biofertilizante aisladas de suelos del departamento de Sucre. Para ellos se evaluaron diferentes parámetros físico-químicos, que permitieron inferir sobre su potencial para ser utilizado como alternativa frente a los fertilizantes químicos en diferentes cultivos de la región.

Metodología

Para el aislamiento de bacterias nativas con potencial biofertilizantes se tomaron muestras de suelos de cultivos agrícolas (yuca y frijol) en el Indicar donde se realizó el experimento (localidad exacta).

El presente estudio se realizó en fincas ganaderas del municipio de San Juan de Betulia, en el departamento de Sucre, a una distancia de 21 km de la ciudad de Sincelejo, departamento de Sucre. Piso térmico cálido, presenta dos estaciones climáticas bien marcadas, la estación de lluvia y la estación de sequía de forma (unimodal o bimodal), con una temperatura media de 30°C y una humedad relativa de 80%. San Juan de Betulia se caracteriza por tener extensas sabanas aptas para la ganadería y la agricultura. Se encuentra distribuido en toda la extensión del territorio desde el norte hasta el sur y de este a oeste. Posee lomas conformadas por arcillas carbonatadas, arcillolitas y areniscas con textura arcillosa moderadamente bien drenados y moderadamente profundos y con alta fertilidad.

La Figura 4 representa la zona donde fue realizado el muestreo de suelo correspondiente al municipio de San Juan de Betulia en el Departamento de Sucre.



Figura 4. Vista satelital del municipio San Juan de Betulia, departamento de Sucre. Tomado de (Google Map, 2017).

Aislamiento de bacterias

Las muestras de suelo fueron colectadas de las áreas destinadas para el cultivo de yuca y frijol en el municipio de San Juan de Betulia del departamento de Sucre. En zig-zag abarcando una extensión de 3 Ha. Se tomó las muestras a 15 cm de la superficie de la rizósfera, retirando la capa superficial (hojarasca y materia orgánica semidescompuesta), Se homogenizaron las muestras en cada lote de terreno y se realizó un cuarteo para obtener 1000 g de suelo representativo de cada uno (Lara y Oviedo, 2008). Las muestras fueron llevadas al laboratorio de biotecnología de la Universidad de Córdoba.

Aislamiento primario de los microorganismos

Se realizaron diluciones seriadas de 1:10, de la 10^{-1} hasta 10^{-7} , las dos últimas fueron sembradas en caja de Petri con medios apropiados e incubadas a una temperatura de 28 °C durante 2 días; después de este tiempo se revisaron las cajas de Petri y se observaron las colonias típicas. Se emplearon el medio de cultivo Burk's para aislar y multiplicar microorganismos fijadores de nitrógeno y productores de ácido indol acético (AIA) (Buchanan y Gibbonns, 1994; Park et ál, 2005; Tejera y Lluch, 2005; Lara et al, 2007). Por su parte se utilizó el medio NBRIP (Kumar y Narula; 1999), para aislar y multiplicar microorganismos solubilizadores de fosfato. Se hicieron ensayos por triplicado.

Aislamiento secundario

A partir de los microorganismos obtenidos en el aislamiento primario se realizaron repiques de las colonias en medios de cultivos selectivos. Medio de cultivo Burk's para aislar y multiplicar microorganismos fijadores de nitrógeno y productores de ácido indol acético (AIA) (Buchanan y Gibbonns, 1994; Park et ál, 2005; Tejera y Lluch, 2005; Lara et al, 2007) y el medio NBRIP (Kumar y Narula; 1999) para microorganismos solubilizadores de fosfato. Se llevaron a incubación y se hicieron observaciones de las colonias típicas nuevamente con el fin de tener cultivos axénicos (Lara & Oviedo, 2008). Se hizo revisión del crecimiento de las colonias en cajas de Petri para las observaciones de características macroscópicas y se aplicó el método de Tinción de Gram para observar características microscópicas. Se hicieron ensayos por triplicado.

Cuantificación de la fijación de nitrógeno, solubilización de fosfatos y producción de auxina

Prueba de solubilización de fosfato tricálcico

Para la determinación de fosfato se empleó el método vanadomolibdofosfórico (Sancho et al., 2004). Las bacterias aisladas fueron reactivadas en cajas de Petri con medio de cultivo NBRIP sólido para luego ser inoculadas en 10 ml de medio de cultivo NBRIP líquido previamente estéril y se incubaron por 48 horas en agitación constante de 150 rpm a una temperatura aproximada de 29 °C. Luego por el método de diluciones seriadas se verificó concentraciones de 10-8 UFC. Las muestras se centrifugaron y se tomaron 7 ml del sobrenadante, se le agregaron 2 ml de reactivo Vanadatomolibdato y se aforaron hasta 10 ml con agua destilada. Se dejaron en reposo por 10 minutos y posteriormente se procedió a leer la absorbancia a 440 nm., en el espectrofotómetro Perkin- Elmer Lambda 11 UV-Vis. La intensidad de color amarillo en la prueba es proporcional a la concentración de fosfato. Para esta prueba los blancos fueron medios de cultivo NBRIP líquido estéril y sin microorganismos. La lectura de las absorbancias obtenidas de los medios inoculados se corrigió teniendo en cuenta los blancos.

Para realizar la curva patrón y determinar su ecuación se prepararon soluciones patrones de 40, 80, 120, 160, 200 y 240 ppm a partir de una solución estándar de 319,5 ppm de Fosfato ácido de Potasio (KH_2PO_4) con un volumen total de 25 ml y se procedió a aplicar el mismo tratamiento que a las cepas bacterianas. Una vez obtenidos los datos de absorbancias estas fueron reemplazadas en la ecuación de la curva patrón calculando así las concentraciones de fosfatos. Todo el proceso se hizo por triplicado.

Determinación de la actividad fijadora de nitrógeno

Para evaluar la capacidad fijadora de nitrógeno de las poblaciones aisladas, se utilizó el método de valoración del ión amonio empleando la técnica calorimétrica de Berthelot (fenol-hipoclorito) (Lara y Villalba, 2007).

El procedimiento consistió en inocular los aislados, en un medio de suelo al 10%, y luego incubarlos a una temperatura de 28-29 °C durante un tiempo de 48 horas con agitación constante a 150 rpm. Por el método de

diluciones seriadas se verificó concentraciones de 10^{-8} UFC. Pasado este tiempo, se añadió 25 ml de cloruro de potasio (KCl) 2M, manteniéndose el proceso de agitación por una hora más; seguidamente se dejó en reposo hasta que todo el suelo se depositó en el fondo; se tomaron 10 ml del sobrenadante, se centrifugaron a 2000 rpm durante 20 minutos, se le adicionaron 0,4 ml de solución alcohólica de fenol al 10%, 0,4 ml de nitroprusiato de sodio al 0,5% y 1 ml de solución oxidante, la cual se preparó mezclando 20 g citrato de sodio, 1 g de hidróxido de sodio y 1 ml de hipoclorito de sodio 1,5 N en 100 ml de H_2O .

La mezcla se mantuvo en reposo durante 1 hora y posteriormente se midió la absorbancia a 632,9 nm en un espectrofotómetro Perkin-Elmer Lambda 11 UV-Vis. Como blancos de suelo se utilizaron muestras de tierras esterilizadas (sin microorganismos) a las cuales se les determinó la concentración del ión amonio por el método descrito anteriormente. Para esta prueba el color azul indicaba la concentración de nitrógeno fijada. La evaluación de las muestras se realizó por triplicado.

Las concentraciones de amonio obtenidas del sistema (suelo inoculado) fueron corregidas teniendo en cuenta los blancos de suelo. La curva patrón se trazó a partir de una solución estándar de 80 ppm de NH_4Cl , y el rango de trabajo fue de 0,8-5,6 ppm (mg/l). Los valores de absorbancia fueron reemplazados en la ecuación de la curva patrón obteniendo así los valores reales de concentraciones fijadas de nitrógeno.

Cuantificación de la producción de ácido indol acético (AIA)

Para la evaluación química de AIA se utilizó medio de cultivo Burk's líquido libre de nitrógeno y con glucosa como su fuente de carbono, sales minerales y agua destilada (Park et al, 2005). El pH fue ajustado a 6,8 y posteriormente se esterilizó a $121^{\circ}C$ durante 15 minutos.

Para la determinación de la producción de AIA se empleó el reactivo de Salkowski ($FeCl_3 \cdot 6H_2O$ 0.01 M y H_2SO_4 7.1 M) método colorimétrico preparado a partir de cloruro férrico. Se inoculó cada colonia de microorganismos en medio Burk's líquido suplementado con triptófano al 1% (composición por litro glucosa 5 g, Na_2HPO_4 1 g, NH_4NO_3 0.4 g, $NaCl$ 0.2, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.4 g, triptófano 1 g) en recipiente esterilizados previamente. Se llevó a agitación constante a 150 rpm a una temperatura

de 29°C por 48 horas (Lara et al, 2007). Se verificaron concentraciones de 10-8 UFC por el método de diluciones seriadas. Pasado este tiempo se centrifugó a 4000 rpm por 15 min. Se tomó 4 ml del sobrenadante, se pasó a un tubo de ensayo y se agregó 2 ml del reactivo de Salkowsky. Posteriormente se incubó en oscuridad a temperatura ambiente de 25°C por 30 min., la lectura se realizó por espectrofotometría a una absorbancia de 530 nm. La intensidad de color rosado es proporcional a la producción de AIA. La preparación de las soluciones patrones fueron a 3.2, 6.4, 9.6, 12.2, 16.24, 30.4 y 45 ppm a partir de una solución estándar de 160 ppm. Estas soluciones se realizaron por triplicado. Las lecturas de las absorbancias fueron corregidas con el blanco (medio Burk's líquido suplementado con triptófano al 1% sin microorganismos) y luego reemplazadas en la ecuación de la curva patrón obteniendo así los valores de producción de ácido indol acético (AIA). Ensayos por triplicados.

Resultados y discusión

Aislamiento de bacterias nativas con potencial biofertilizante aisladas de suelos agrícolas

Aislamiento

Utilizando el medio selectivo Burk's fueron obtenidos 38 aislados para microorganismos fijadores de nitrógeno y productores de ácido indol acético (AIA) (Buchanan, 1994; Park et al, 2005; Tejera, 2005 & Lara et al, 2007), de los cuales 24 pertenecieron a suelos donde estaba establecido el cultivo de yuca y 14 al de frijol. A partir del medio NBRIP para microorganismos solubilizadores de fosfatos (Kumar&Narula; 1999) fueron 24 los aislados, con 12 cepas para cada respectivo cultivo.

Por su parte, Lara et al (2011) en un estudio realizado en zona rural del municipio de Montería, Córdoba, obtuvieron un total de 61 bacterias aisladas con el fin de determinar su capacidad de solubilización de fosfatos. También en una investigación en municipio de Mérida, Yucatán fueron 83 los microorganismos bacterianos aislados, de la cuales 22 fueron obtenidos de las plantas de chile habanero, 31 de maíz y 30 de calabaza (Noh, et al, 2014). En otro estudio realizado en el Fundo San Martín de Porres en Tacna – Perú se aislaron y caracterizaron 104 cepas de bacterias diazotróficas nativas de la rizósfera del olivo (Clavijo et al, 2012).

Un gran número de las bacterias aisladas en el presente estudio fueron Gram negativas (66,6 %), el resto fueron Gram positivas (33,3%). A nivel microscópico se encontraron formas que variaron entre ovaladas, cilíndricas o de bastones; rectos o curvos (bacilos).

Estos resultados se pueden comparar con datos similares reportados por Lara et al (2011) donde, según la coloración Gram, se evidenció que la mayor parte de las bacterias aisladas fueron Gram negativos (93%). Además de encontrar bacilos Gram positivos (5%) y cocos Gram positivos (2%).

Por otro lado, las bacterias se multiplicaron rápidamente y con incubaciones de 24 horas se hicieron visibles como colonias en los medios de cultivo sólidos. Las características de las colonias de las diferentes cepas bacterianas variaron, unas más pequeñas y otras bastante grandes. Se observaron formas circulares e irregulares, con superficies planas o convexas y en relación a la pigmentación que adquieren hubo cepas grises, amarillas, azules y otras algo transparentes.

Cuantificación de la fijación de nitrógeno, solubilización de fosfatos y producción de auxina.

Prueba de medición de solubilización de fosfato tricálcico.

De la curva de calibración se obtuvo la ecuación $y = 0,0062x - 0,0015$ con un R^2 igual a 0,9945, la cual permitió describir el comportamiento de las absorbancias de fosfatos a diferentes concentraciones y longitud de onda máxima. A partir de la ecuación se calcularon las concentraciones de fosfatos producidos por los microorganismos en estudio.

Los 24 microorganismos aislados en medio NBRIP fueron evaluados químicamente en su actividad solubilizadora de fosfatos. 11 bacterias fueron solubilizadoras de fosfato con un máximo de 236,290 ppm y un mínimo de 42,741 ppm. El resto estuvieron por debajo del valor o no lograron solubilizar fosfatos. Del cultivo de yuca 8 de 12 arrojaron concentraciones y 2 no lo hicieron (Tabla 1), mientras que del cultivo de frijol solo 3 de los 12 aislados mostraron concentraciones dentro de la curva (Tabla 2).

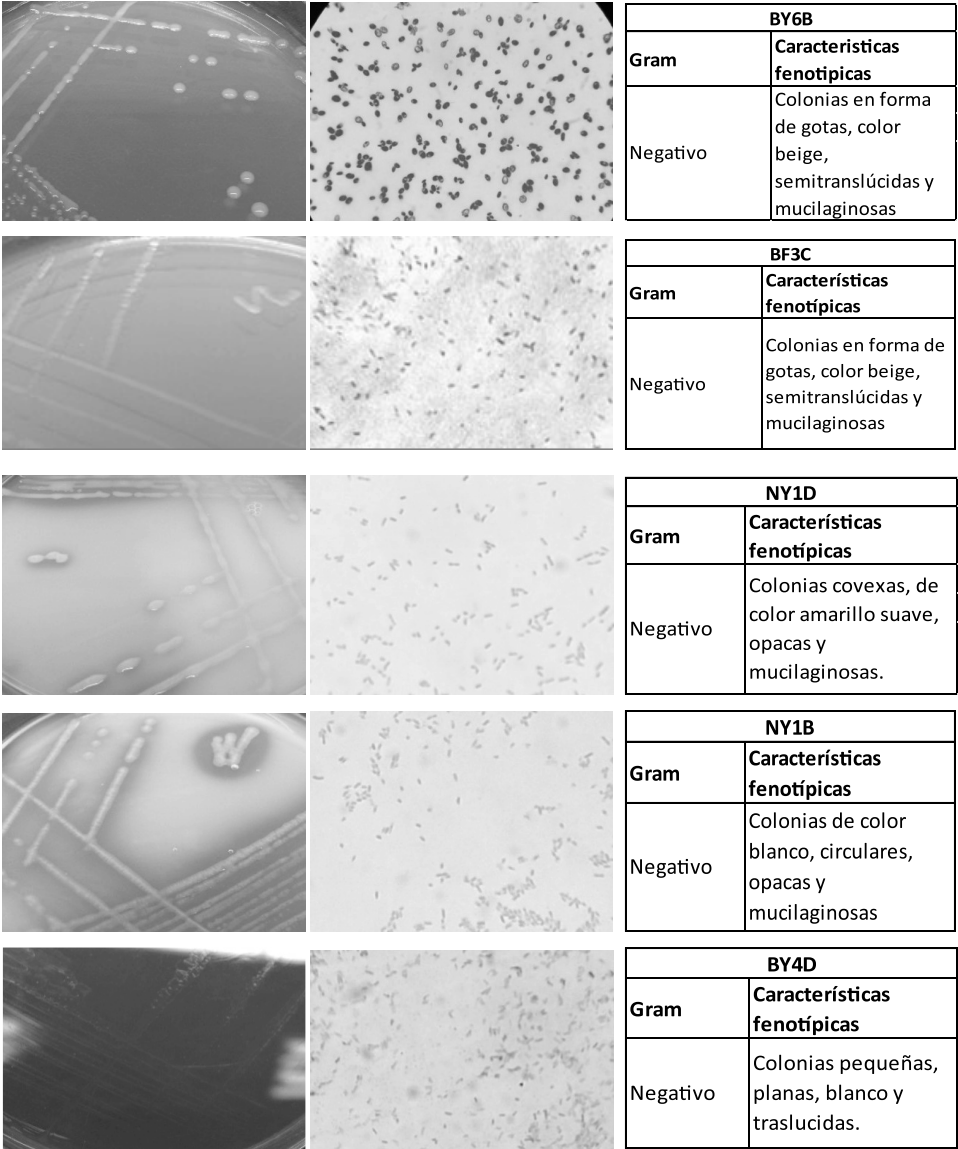


Figura 5. Descripción macroscópica y microscópicas de las bacterianas nativas aisladas y que presentaron un mayor potencial biofertilizante (BY6B, BF3C, NY1D, NY1B, BY4D).

Tabla 1.Concentración de fosfatos de aislados de la rizósfera de yuca (Manihot esculenta).

MUESTRA	CONCENTRACIÓN (ppm)
NY1B	236,290
NY1D1	212,096
NY1F	123,387
NY5B	113,709
NY1D2	73,387
NY1E	45,967
NY2B	45,967
NY1C	42,741

Fuente: cálculos del estudio

Tabla 2.Concentración de fosfatos de aislados de la rizósfera de frijol (Phaseolus vulgaris).

MUESTRA	CONCENTRACIÓN (ppm)
NF1D1	144,355
NF2F	121,774
NF2A2	110,484

Fuente: cálculos del estudio

La cepa bacteriana NY1B se identificó como la más eficiencia en solubilización de fosfatos. Dicho aislado correspondió a bacilos Gram negativos, y a nivel macroscópico por colonias circulares de color crema para el primero con bordes elevados, lisos y brillantes. Por otro lado el asilado NY1D1 fue la cepa con la segunda mayor concentración de fosfatos (212,096 ppm).

Estudios anteriores han demostrado la capacidad de algunas bacterias para solubilizar fosfatos y de formas variables. Lara et al (2013), reportó la especie *Enterobacter cloacae* en suelos del departamento de Sucre como solubilizadores de fosfatos (596 ppm), con un valor superior al encontrado en la presente investigación para la cepa NY1B (236,290 ppm) para el mismo departamento. Lara et al, (2011) también ubican al género *Enterobacter* como microorganismos solubilizadores de fosfatos.

Collavino et al. (2010) aislaron cepas bacterianas solubilizantes de las raíces y rizósfera de yerba mate, y fueron asignados a los géneros *Enterobacter*, *Pantoea*, *Pseudomonas*, *Acinetobacter*. También, otros estudios pusieron en evidencia la capacidad solubilizadora de fosfatos de *Enterobacter*, además de otros géneros como *Erwinia*, *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Rhizobium*, *Klebsiella*, *Burkholderia*, *Serratia*, *Achromobacter*, *Agrobacterium*, *Micrococcus*, *Aerobacter*, *Flavobacterium*, *Enterobacter*, *Klebsiella*, *Arthrobacter*, *Rhodobacter*, *Pantoea* y *Klebsiella*, entre las bacterias (Patiño y Sanclemente, 2014). Por su parte Yi et al. (2008) demostraron que la producción de exopolisacáridos confiere mayor capacidad de solubilización fosfatos insolubles al género *Enterobacter* sp.

Fernández et al (2008) caracterizaron una cepa de *P. dispersa* demostrando que la misma actuaba como bioestimuladora del crecimiento vegetal (PGPR) comprobándose su capacidad como solubilizadora de fosfatos en medios axénicos. También Berrío et al. (2012) reafirmó que *P. dispersa* es fosfato solubilizadora a bajas temperaturas.

El proceso de solubilización de fosfatos es de gran importancia para las plantas. Tanto así que Lara et al (2011) mencionan que las bacterias que solubilizan fosfato representan el 10% de la población microbiana del suelo.

Medición del ion amonio en la determinación de la capacidad fijadora de nitrógeno.

La técnica calorimétrica de Berthelot (fenol-hipoclorito) permitió evaluar la capacidad fijadora de nitrógeno de las cepas bacterianas en estudio. Esta técnica consiste en la reacción del amonio con el fenol e hipoclorito en medio alcalino produciendo azul de indofenol determinado colorimétricamente (Lara y Villalba, 2007) (Figura 6).

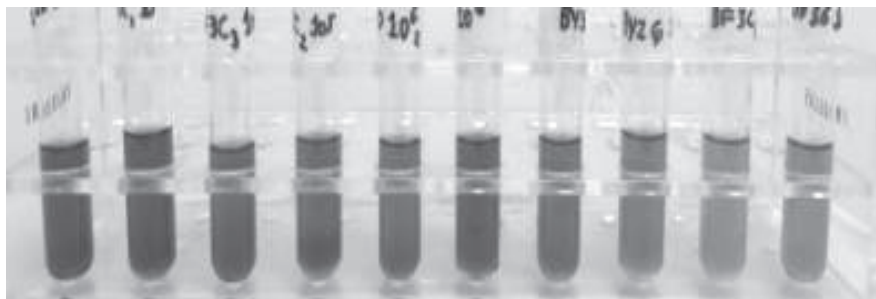


Figura 6. Prueba fisicoquímica para determinar la concentración de amonio producido por aislados bacterianos.

Para determinación de las concentraciones de nitrógeno en las cepas bacterianas se usó la ecuación de la curva de calibrado: $Y = 0,220X + 0,008$
 $R^2 = 0,998$

Para la prueba de nitrógeno se evaluaron químicamente 38 muestras aisladas en medio Burk's. Sólo 16 mostraron ser fijadoras de nitrógeno, 10 correspondientes a rizósfera de yuca (*Manihot esculenta*) y 6 a la rizósfera de frijol (*Phaseolus vulgaris*). La mayor concentración fijada fue de 4,716 ppm para la cepa BY4D y la menor fue de 0,807 ppm para BY5A (tabla 3). El resto de las cepas evaluadas mostraron valores por debajo de la curva de calibrado o no fijaron nitrógeno.

Tabla 3. Concentración de amonio producido por aislados de la rizósfera de yuca (*Manihot esculenta*).

MUESTRA	CONCENTRACIÓN (ppm)
BY4D	4,716
BY3B	4,577
BY3G	2,289
BY2G	2,164
BY4B	1,018
BY1D	0,895
BY4E	0,868
BY3D	0,843

MUESTRA	CONCENTRACIÓN (ppm)
BY2D	0,830
BY3B	0,814

Fuente: cálculos del estudio

Tabla 4. Concentración de amonio producido por los aislados de la rizósfera de frijol (*Phaseolus vulgaris*).

MUESTRA	CONCENTRACIÓN (ppm)
BF3C	1,655
BF2E	1,170
BF1B	1,148
BF3D	1,089
BF2B	0,889
BF3A	0,870

Fuente: cálculos del estudio

La cepa BY4D con 4,716 ppm mostró los mejores valores para concentraciones de amonios, son bacterias Gram negativas con colonias de forma lisa, redondas, con bordes irregulares y color beige.

El género *Pseudomonas* se encuentra reportado como fijador de nitrógeno atmosférico. Orozco y Martínez (2009) aislaron a partir de la rizósfera de *P. patulabacterias* fijadoras de nitrógeno y las pruebas bioquímicas sugirieron que el 29 % de las mismas pertenecían al género *Pseudomonas* sp. Santillana (2006) por su parte, evaluó tres tipos de cepas de *Pseudomonas* sp como inoculantes en diferentes cultivos bajo condiciones de invernadero, entre ellos la papa y el tomate. En Cuba también se han realizado un grupo de ensayos para el uso de biofertilizantes a base de bacterias promotoras de crecimiento vegetal (PGPB) con resultados importantes en especies del género *Pseudomonas* (Torriente, 2010).

Otros estudios involucran las *Pseudomonas* como productoras de AIA (Noh et al, 2014) y otros dentro de un gran número de bacterias que

destacan por su potencial como biofertilizantes (Díaz et al., 2001; Zago et al., 2000). Por su parte Fathalla et al. (2005) describen ocho cepas del genero *Pseudomonas* como productoras de AIA; *Pseudomonas entomophila*, *P. mosselii*, *P. parafulva*, *P. corrugado*, *P. anguilliseptica*, *P. putida*, *P. argentinensis*, y *Pentomophila* con valores oscilados entre oscilaron entre 7,84 y 19,59 ppm.

Por otro lado, se han encontrado otros microorganismos con capacidad de fijar nitrógeno. Lara y Oviedo (2008) reportan el género *Azotobacterspp* y *Azospirillumsp* en los municipios de Montería, Cereté, Ciénaga de Oro, San Carlos y San Pelayo (departamento de Córdoba) como microorganismos fijadores de nitrógeno con concentraciones para *Azotobacterspp* de hasta 3,734 ppm (San Carlos) y 3,207 ppm para *Azospirillumsp* (San Carlos), mientras que especies del género *Pseudomonas* estuvieron por debajo del rango o no produjeron. Se resalta entonces que la *Pseudomonas argentinensis* aislada en el presente estudio si presentó capacidad de fijación de nitrógeno, incluso con una concentración más alta que las reportadas para otros microorganismos.

Los resultados en esta investigación demuestran que existen microorganismos con capacidad de convertir el nitrógeno atmosférico en amonio. Esto se evidencia en que dentro del experimento las cepas bacterianas no disponían de fuentes de nitrógeno diferente al que se encontraba en el aire del recipiente que los contenía debido a que el medio de cultivo estaba libre de este elemento. Los microorganismos que fijan nitrógeno contienen nitrogenasa, encargada de romper el triple enlace del nitrógeno molecular y que permite la formación amoniaco liberando hidrógeno.

Evaluación de la producción de auxina: Ácido Indol Acético (AIA)

Se empleó el método colorimétrico utilizando el reactivo Salkowski para determinar químicamente las concentraciones de auxina (AIA) (Mayer, 1958). Este método es de gran sensibilidad y muy específico en el análisis de la producción de AIA por los microorganismos a evaluar (Glickmann y Deessaux, 1995) y se basa en que el reactivo de Salkowski oxida el AIA lo que genera una coloración rosa en las muestras en estudio que depende de la concentración presente.

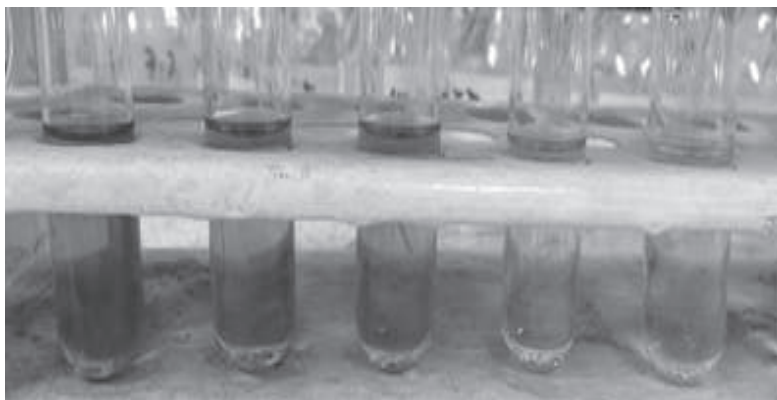


Figura 7. prueba fisicoquímica para determinar la producción de AIA de las diferentes cepas bacterianas aisladas.

Algunos estudios demuestran que el Ácido Indol Acético es sintetizado a partir del Triptófano a través de una conversión oxidativa realizada por microorganismos (Muller y Weiler, 2000). Para esta investigación se adiciono L-triptófano al medio de cultivo Burk's con el fin de inducir la producción de dicha auxina.

Las concentraciones de AIA de las cepas bacterianas se determinaron a partir de la ecuación de la curva de calibrado que se muestra a continuación: $Y=0,0285X+0,0133$, $R^2 = 0,9999$. Donde Y es la absorbancia leída en el espectofotómetro y X la concentración en ppm.

Los 38 microorganismos aislados en medio Burk's fueron evaluados químicamente en su actividad como productores de AIA. 12 bacterias fueron productoras de auxina (AIA) con un máximo de 44,323ppm y un mínimo de 3,225 ppm. El resto de las muestras estuvo por debajo de estos valores o por debajo de la curva. Del cultivo de yuca (*Manihot esculenta*) 7 arrojaron concentraciones (Tabla 5), mientras que del cultivo de frijol (*Phaseolus vulgaris*) solo 5 de los 12 aislados mostraron concentraciones dentro de la curva (Tabla 6).

Tabla 5. Concentración de Ácido Indol Acético producidos por aislados de la rizósfera de yuca (*Manihot esculenta*).

MUESTRA	CONCENTRACIÓN (ppm)
BY6B	44,323
BY4B	32,621
BY6A	11,533
BY2B	4,814
BY3D	4,744
BY2F	4,516
BY2G	4,253

Fuente: cálculos del estudio

Tabla 6. Concentración de Ácido Indol Acético producidos por aislados de la rizósfera de frijol (*Phaseolus vulgaris*).

MUESTRA	CONCENTRACIÓN (ppm)
BF3C	29,533
BF1C	9,639
BF1B	9,498
BF4A	3,227
BF2D	3,225

Fuente: cálculos del estudio

De acuerdo con los resultados, las bacterias con mayor número de cepas que arrojaron concentraciones de AIA fueron las aisladas de la rizósfera de la yuca (*Manihot esculenta*). La cepa BY6B fue la Cepa más eficiente dentro del grupo que arrojaron resultados positivos en la prueba. Son bacilos Gram negativos, sus colonias son de color blanco a beige, circulares, concavas, semitraslucidas u opacas y mucilaginosas o mucoides.

Bergottini et al., (2015) hicieron un estudio donde seleccionaron tres aislados por ser los mejores en su actividad de fijación de nitrógeno, producción de AIA y solubilización de fosfatos, como alternativa sostenible para mejorar el rendimiento en cultivos, y reportaron a *Rhizobium pusense* como el mayor productor de AIA.

A pesar de los pocos reportes de la capacidad de *Rhizobium pusense* parasintetizar ácido indol acético existen más para el género *Rhizobium* (Patten & Glick, 1996; Anwar, 2000), además de los otros microorganismos ya ampliamente conocidos como *Azospirillum*, *Azotobacter* y *Pseudomonas*. Joseph et al. (2007), por su parte establecieron en su estudio que el 85,7% del total de los aislados de *Rhizobium* fueron capaz de producir IAA. Otras especies del género *Rhizobium* sintetizan AIA, *Rhizobium meliloti*, (20 ppm) (Williams y Singer, 1990), *Rhizobium leguminosarum* (2,0 ppm) (Beltra et al., 1980).

Según los resultados *Rhizobium pusense* tuvo la máxima producción obtenida y fue superior a la de otros microorganismos reportados en la literatura como *Azospirillum lipoferum* (16-32 ppm), *Xanthomonas* sp. (20 ppm) *Pseudomonas* spp. (20-65 ppm). De igual forma, estuvo por encima de valores reportados para microorganismos de su mismo género con producciones de AIA de 22 ppm (Anwar, 2000; Rives et al., 2004; Somers et al., 2005; Vandeputte et al., 2005).

Además de ser productor de AIA, *Rhizobium pusense* se ha reportado como eficientes fosfato solubilizadoras con concentraciones de 273,84 ppm y 262,83 ppm (Ali et al., 2015).

Bajas concentraciones de AIA han demostrado que son capaces de estimular el desarrollo vegetal y que altas cantidades pueden llegar a inhibir y reducir el alargamiento del tallo (Ramirez y Pérez, 2006; Hernández, 2002), lo que quiere decir que no siempre que se evalúa la producción de AIA y se arrojen valores altos o bajos, se pueda concluir respecto a su capacidad para estimular el desarrollo de la planta.

Se ha propuesto la **Vía indol-3-piruvato (IPA) como la ruta principal para la biosíntesis de Ácido Indol Acético (AIA) en plantas y ha sido descrita en bacterias del género *Rhizobium***. Tiene tres etapas principales, la primera la conversión de triptófano a ácido indol-3-pirúvico por una aminotransferasa. Una segunda etapa donde el ácido indol-3-pirúvico se descarboxila a ácido indol-3-acetaldehído por la indol-3-piruvato descarboxilasa (IPDC), siendo esta la etapa limitante de la síntesis. Y en la última etapa, el indol-3-acetaldehído es oxidado a AIA por la indol-3-acetaldehído deshidrogenasa (Vega et al., 2016).

Conclusiones

A partir de los medios selectivos fueron obtenidos 62 aislados de los cultivos de yuca y frijol, dentro de los cuales el 66,6 % fueron Gram negativos y 33,3 % Gram positivos. Donde la Cepa

Las Cepas BY4D, BY6B y NY1B mostraron tener potencial biofertilizante de acuerdo a las pruebas fisicoquímicas aplicadas pues arrojaron los mejores valores de acuerdo con las pruebas. BY4D fue la Cepa que presentó la más altos valores de concentración del ión amonio (4,716 ppm), BY6B para AIA (44,323 ppm) y para la prueba de solubilización de fosfatos NY1B (236,290 ppm).

Referencias Bibliográficas

- Ali, A., Khalid, R., Ali, S. Akram, Z., Hayat, R. (2015). Characterization of Plant Growth Promoting Rhizobacteria Isolated from Chickpea (*Cicer arietinum*). *British Microbiology Research Journal*. 6(1): 32-40.
- Anwar, G. (2000). Production of growth hormones and nitrogenase by diazotrophic bacteria and their effect on plant growth. PhD thesis, Universidad of the Punjab, Lahore. pp. 9-25;32-44.
- Armenta, A., Garcia, C., Camacho, J., Apodaca, M., Gerardo, L., y Nava, E. (2010). Biofertilizantes en el desarrollo agrícola de México. *Ra Ximhai*. *Revista de Sociedad, Cultura y Desarrollo Sustentable* 6(1), 51-56.
- Asociación Internacional de la Industria de los Fertilizantes (IFA). (2011). *Los fertilizantes y su uso*. París.
- Azcón-Bieto, J., y Talón, M. (2008). *Fundamentos de Fisiología Vegetal*. España: McGraw-Hill/Interamericana de España, S. A. U. 656 p.
- Baca, B.; Soto, L.; Pardo, M. 2000. Fijación biológica del nitrógeno. *Rev. Elementos*, núm. 38.
- BANCO DE LA REPÚBLICA. (2016). "Informe de coyuntura económica regional (ICER)". Departamento de Sucre. [en línea] disponible en <http://www.banrep.gov.co/es/>.

- Bashan, Y. (1998). Significance of timing and level of inoculation with rhizosphere bacteria on wheat plant. *Soil Biology Biochemistry*. Vol. 18. p. 297-301.
- Bashan, Y. & Levanony, H. (1988). Absorption of the rhizosphere bacterium *Azospirillum brasilense* Cd to soil, sand and peat particles. *J. Gen. Microbial*. 134: 181- 1820 p.
- Beltra, R., Díaz, F. and Fraile G. (1980). The formation of growth substances by *Rhizobium* species. *Z. Bakteriologie Parasitenkunde Infektionskrankheiten Hygiene*. 135, pp. 617-622
- Bergottini, V., Otegui, M., Sosa, D., Zapata, P., Mulot, M., Rebord, M., Zoppi, J., Wiss, F., Benrey, B. and Junier, P. (2015). Bio-inoculation of yerba mate seedlings (*Ilex paraguariensis* St. Hill.) with native plant growth-promoting rhizobacteria: a sustainable alternative to improve crop yield. *Biol Fertil Soils*. DOI 10.1007/s00374-015-1012-5
- Berrios, G., Cabrera, G., Gidekel, M. y Gutiérrez, A. (2012). Characterization of a novel antarctic plant growth-promoting bacterial strain and its interaction with antarctic hair grass (*Deschampsia antarctica* Desv). *Polar Biol* DOI 10.1007/s00300-012-1264-6.
- Blakeslee, J., Ann Peer, W., & Murphy, A. (2005). MDR/PGP Auxin transport proteins and endocytic cycling. *Plant Cell Monographs* 1(1), 159-176.
- Bonomelli, C., Bonilla, C., Valenzuela, A., & Saavedra, N. (2002). Presencia de cadmio en fertilizantes fosforados de diferente procedencia comercializados en Chile. Segunda temporada. *Simiente. Sociedad Agronómica de Chile* 72(1-2), 9-16.
- Buchanan, R. & Gibbons, N., (1994). *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*, 9th de Baltimore: Williams and Wilkins Company, 135-136 p.
- Castillo, G., Altuna, B., Michelena, G., Sánchez-Bravo, J., y Acosta, M. (2005). Cuantificación del contenido de ácido indolacético (AIA) en un caldo de fermentación microbiana. *Anales de Microbiología* (21), 137-142.
- Clavijo, C., Chipana, V; Centeno, J.; Zúñiga, D.; Guillén, C. (2012). Aislamiento, caracterización e identificación de bacterias diazotróficas de la rizósfera del cultivo de *Olea europea* "olivo" en Tacna Perú.

- Ecología Aplicada, vol. 11, núm. pp. 89-102 Universidad Nacional Agraria La Molina. Lima, Perú
- Collavino, M., Sansberro, P., Mroginski, L., Aguilar, O. (2010) Comparison of in vitro solubilization activity of diverse phosphate-solubilizing bacteria native to acid soil and their ability to promote *Phaseolus vulgaris* growth. *Biol Fertil Soils* 46:727–738. doi:10.1007/s00374-010-0480
- Corrales, L., Arévalo, Z. y Moreno, V. (2014). Solubilización de fosfatos: una función microbiana importante en el desarrollo vegetal. *Nova*, 12(21), 68-79. Retrieved September 13, 2017, from http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1794247020140001000006&lng=en&tlng=es
- Díaz, P., Ferrera, R., Almaraz, J. & Alcántara, G. (2001). Inoculation of Plant Growthpromoting Bacteria in Lettuce. *Terra*. 19: 327-33
- Espín, G. (2002). Biología de *Azotobacter vinelandii*. En *Micorbios en línea*. Recuperado a partir de <http://www.biblioweb.tic.unam.mx/libros/micorbios/Cap6/>
- FAO e IFA, (2002). Los fertilizantes y su uso: una guía de bolsillo para los oficiales de extensión. 4ta ed. Organización de las Naciones Unidas para la agricultura y la alimentación (FAO) y Asociación Internacional de la Industria de los fertilizantes (IFA). P. 1-8
- Fathalla, M., Samy, A., Metwaly A., and Elshahat M. (2015). Antifungal Activity and Genetic Diversity of Selected Endophytic Fluorescent Pseudomonads. *Journal of Applied Plant Protection*; Suez Canal University.
- Fernández. A., Villaverde, M., Nicolás, J., García, A. y Malo, J. (2008). Pantoea dispersa; Rhizobacteria promotora del crecimiento vegetal (PGPR). VII Congreso SEAE Bullas (Murcia)
- Gobernación de Sucre (2016). Plan de Desarrollo 2016 – 2019. Sucre progresa en Paz.
- Gómez, J. (2000). Abonos Orgánicos. Universidad Nacional de Colombia. Santiago de Cali, Colombia. p.26-32.
- Glickmann, E. y Deessaux, Y. (1995). Acritical examination of the specificity of the Salkosky reagent for indolic compounds produced by

phytopathogenetic bacteria. *Soil Biology and Biochemistry* 45:631-640.

- Hernández, A., (2002). Obtención de un biopreparado a partir de rizobacterias asociadas al cultivo del maíz (*Zea Mays* L.). Tesis de doctorado. Universidad de La Habana
- IDEAM, U.D.C.A (2015). Síntesis del estudio nacional de la degradación de suelos por erosión en Colombia - 2015. IDEAM - MADS. Bogotá D.C., Colombia., 62 págs. Publicación aprobada por el IDEAM, Diciembre de 2015, Bogotá D.C., Colombia.
- Joseph, B., Ranjan, R. y Lawrence R. (2007). Characterization of plant growth promoting rhizobacteria associated with chickpea (*Cicer arietinum* L.). *International Journal of Plant Production* 1(2).
- Khan, M., Zaidi, A. & Wani, p. (2009). Role of Phosphate Solubilizing Microorganisms in Sustainable Agricultura – A Review. In E. Lichtfouse, M. Navarrete, P Debaeke, S. Véronique & C. Alberola (Eds.), *sustainable Agruculture* (pp. 551-570): Springer Netherlands.
- Kumar, V. & Narula, N., (1999). Solubilization of inorganic phosphates and growth emergence of wheat as affected by *Azotobacter chroococcum*. *Biol. Fertil. Soil*, 28 (1999), pp. 301-305
- Lara, C., Esquivel, L. y Negrete, J. (2011) Bacterias nativas solubilizadores de fosfatos para incrementar los cultivos en el departamento de Córdoba-Colombia. *Biotechnología en el sector Agropecuario y Agroindustrial*. Vol 9 No. 2 (114-120).
- Lara, C., Oviedo, L., (2008). Bacterias diazótrofes con potencial biofertilizante para una agricultura limpia y productiva. Montería, Córdoba: Editorial Ltda.
- Lara, C., Oviedo, L., y Villalba, M. (2007). Bacterias fijadoras asimbióticas de nitrógeno de la zona agrícola de San Carlos. Córdoba. Colombia. *Revista Colombiana De Biotecnología*. ISSN: 0123-3475. Colombia: Instituto De Biotecnología Ibun. Vol.9 Nº 2 Fasc. 2. p.6 - 14.
- Lara, C. y Villalba, M. (2007). Evaluación química del potencial nitrofixador de bacterias nativas de los género *Azotobacter* spp. y *Azospirillum* spp. en la región de San Carlos, Córdoba. Trabajo de grado. Departamento de Química. Universidad de Córdoba.

- Lara, C., Sanes, S. y Oviedo, L. (2013). Impacto de bacterias nativas solubilizadoras de fosfato en el crecimiento y desarrollo de plantas de rábano (*Raphanus sativus* L.). *Biotecnología Aplicada*;30:271-275.
- Lara, C., Oviedo, L. & Betancur, C. (2011). Bacterias nativas con potencial en la producción de ácido indolacético para mejorar los pastos. *Zootecnia Tropical*, 29(2), 187-194. Recuperado en 07 de octubre de 2017, de http://www.scielo.org.ve/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0798726920110002000005&lng=es&tlng=es.
- Martínez, M. 1999. Seminario Microbiología de suelos. Memorias, Cooperativa de Profesionales para el Desarrollo de Tecnología Ambiental LTDA. B/manga. Santander, Colombia.
- Mayer, A. (1958). Determination of indole acetic acid by the Salkowsky reaction. *Nature* 162 : 1670-1671.
- MINISTERIO DE AGRICULTURA Y DESARROLLO RURAL. (2005). Observatorio Agrocadenas Colombia. Documento de Trabajo No. 68. La cadena de cultivos ecológicos en Colombia. Una mirada global de su estructura y dinámica. p. 1-2
- Morales, M. (2007). Los biofertilizantes. Una alternativa productiva, económica y sustentable. *Estudios agrarios. Revista de la procuraduría agraria* 1(36), 93-
- Müller, A. & Weiler E. (2000). IAA-synthase, an enzyme complex from *Arabidopsis thaliana* catalyzing the formation of indole-3-acetic acid from (S)-tryptophan. *Biology and Chemistry* 381: 679-686.
- Noh, J., Yam, C., Borges, L., Zúñiga, J. y Godoy, G. (2014). Aislados bacterianos con potencial biofertilizante para plántulas de tomate. *Terra Latinoamericana* 32: 273-281.
- Orozco, C. y Martínez, P. (2009). Evaluación de la inoculación con microorganismos fijadores de nitrógeno asimbióticos aislados de la rizósfera de *Pinus patula* en Colombia. *BOSQUE* 30(2): 70-77
- Park, M., Kim, CH., Yang, J., Lee, H., Shin, W., Kim, S. & Sa, T. (2005). isolation and characterization of diazotrophic growth promoting bacteria from rhizosphere of agricultural crops of Korea. *Microbiological Resear* 160: 127-133 p
- Park, M., Chungwoo, K. Yanga, J., Hyoungseok, L., Wansik, S., Seunghwan, K. & Tongmin, S. (2005). Isolation and characterization of diazo-

trophic growth promoting bacteria from rhizosphere of agricultural crops of Korea. *microbiological Research* 160 : 127-133.

- Park, J., Hornick, S. y Papendick, R. (2002). Transition from conventional agricultura to natural farming systems: The role of microbial inoculants and biofertilizer [en línea] <<http://www.emtech.org/data/pdf/0103.pdf>>
- Patten, C. & Glick, B. (1996). Bacterial biosynthesis of Indole-3-acetic acid (review). *Canadian Journal of Microbiology* 42: 207-220
- Patiño, C. y Sanclemente, O. (2014). Los microorganismos solubilizadores de fósforo (MSF): una alternativa biotecnológica para una agricultura sostenible. Vol. 10 No.2. Pereira, I., Ortega, R., Barrientos, L., Moya, M., Reyes, G. & Kramm, V. (2008). Development of a biofertiliser base don filamentous nitrogen-fixing cyanobacteria for rice crops in Chile. *Journal of Applied Phycology*, 21(1), 135-144. Doi: 10.1007/s108110089342-4.
- Ramírez, R., & Pérez, M. (2006). Evaluación del potencial de los biosólidos procedentes del tratamiento de aguas residuales para uso agrícola y su efecto sobre el cultivo de rábano rojo (*Raphanus sativus* L.). *Revista Facultad Nacional De Agronomía* 59(2), 3543-3556.
- Rives, N., Acebo, Y. y Hernández, A. (2007). Bacterias promotoras del crecimiento vegetal en el cultivo del arroz (*oryza sativa*). *Perspectivas de su uso en cuba. Cultivos Tropicales*. Disponible en:<<http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=193217731004>> ISSN
- Rives, H., Caballero, A., Hernandez, A. y Heydrich, M. (2004). Characterization of rhizobacteria associated ti maize in IAA, siderophores and salicylic acid metabolite production. *Revista colombiana de biotecnologia*. Vol. 6, 1, pp. 6-13.
- Rufina, C. (2012). Fertilización orgánica Vs mineral en el rendimiento y contenido de capsaicina en chile manzano (*Capsicum pubescens*) (Tesis para optar al título de maestra en ciencias). Institución de Enseñanza e Investigación en Ciencias Agrícolas, Montecillo, Texcoco. México. Recuperado a partir de http://www.biblio.colpos.mx:8080/jspui/bitstream/handle/10521/772/Carlos_Marcelo_R_Edafologia_2012.pdf?sequence=1
- Salisbury, F., y Ross, W. (1994). *Fisiología Vegetal*. México: Grupo Editorial Iberoamérica S. A. 451 p.

- Sancho, J., Soriano, M., y Verdú, A. (2004). *Prácticas de Análisis Agrícola*. Valencia: Universidad Politécnica de Valencia. 104 p.
- Santillana, N. (2006). Producción de biofertilizantes utilizando *Pseudomonas* sp. *Ecol Apl.*;5(1-2):87-91.
- Somers, E. Ptacek, D., Gysegom, P., Srinivasan, M, y Vanderleyden, J. (2005). *Azospirillum brasilense* produces the Auxin-like phenylacetic acid by using the key enzyme for indole-3acetic acid biosintesis. *Appl. Envir. Microbiol.* 75: 1803-1810.
- Taiz, L., & Zeiger, E. (2006). *Plant Phyjsiology* (Cuarta Edición.). New York: Sinauer. 1160 p.
- Tejera & Lluch, C. (2005). Isolation and Characterization of *Azotobacter* sp. and *Azospirillum* sp. strains from the sugar cane rizhosphere. *Plant and Soil*, 270: 223-232 p.
- Torriente, D. (2010). Aplicación de bacterias promotoras del crecimiento vegetal en el cultivo de la caña de azúcar. *Perspectivas de su uso en cuba. Cultivos Tropicales*, vol. 31, no. 1, p. 19-26
- Torriente, D. (2010). Aplicación de bacterias promotoras del crecimiento vegetal en el cultivo de la caña de azúcar. *Perspectivas de su uso en cuba. Cultivos Tropicales*, vol. 31, no. 1, p. 19-26
- Vandeputte, O., Oden, S., Vereecke, D., Goethals, K., El jaziri, M. y Presen, E. (2005). Biosynthesis of Auxin by the Gram-Positive Phytopathogen *Rhodococcus fascians* is Controlled by compounds specific ti infected plant tisus. *Appl. Envir. Microbiol.* 75: 11691177.
- Vega, P., Canchignia, H., González, M. y Seeger, M. (2016). Biosíntesis de ácido indol-3-acético y promoción del crecimiento de plantas por bacterias. *cultrop [online]*, vol.37, suppl.1 [citado 2017-09-20], pp. 33-39. Disponible en: <http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S025859362016000500005&lng=es&nrm=iso>. ISSN 1819-4087.
- Yi, Y.; Huang, W. and Ge, Y. (2008). Exopolysaccharide: a novel important factor in the microbial dissolution of tricalcium phosphate. In: *World J. Microbiol. Biotechnol.*, p. 1059- 1065.
- Zago V., De-Polli H. & Rumjanek N. (2000). *Pseudomonas* spp. Fluorescentes – Bacterias promotoras de crecimiento de plantas e biocontroladoras de fitopatógenos em sistemas de produção agrícola.

Caracterización de bacterias nativas con potencial biofertilizante aisladas de suelos del departamento de Sucre

Seropédica: EMBRAPA Agrobiología. 32p. EMBRAPA-CNPAB, Documento N° 127. SIN 0104-6187.



Edición digital

Biotecnología aplicada al sector agropecuario en el departamento de Sucre
Sincelejo, Sucre, Colombia
Septiembre de 2019



PROYECTO FORMACIÓN DE CAPACIDADES EN CIENCIAS,
TECNOLOGÍA E INNOVACIÓN

Núcleo

Innovación y desarrollo de productos biotecnológicos (bioinsumos, bioproductos, bioprocesos) y bioremediación.