

PROGRAMA DE LAS NACIONES UNIDAS PARA EL DESARROLLO



*Al servicio
de las personas
y las naciones*

INFORME FINAL DE PROYECTO

Proyecto: "Utilización de bacterias promotoras del crecimiento como biofertilizantes para incrementar la productividad del cultivo de la caña de azúcar y otros cultivos bioenergéticos "

2020

Número y título del proyecto:

1. Información básica del proyecto

Código: 18.33.26.18

Título del Proyecto: *“Utilización de bacterias promotoras del crecimiento como biofertilizantes para incrementar la productividad del cultivo de la caña de azúcar y otros cultivos bioenergéticos.”*

Asociado en la implementación / Entidad Nacional de Ejecución:

Instituto Cubano de Investigaciones de los Derivados de la Caña de Azúcar (ICIDCA)

Otras partes responsables:

Tres instituciones de la investigación reconocidas de Argentina, Ecuador y Cuba realizan los paquetes de trabajo propuestos. Dos participantes por la parte productiva están de acuerdo en colaborar para proporcionar la información requerida. Estos son:

- Estación Experimental Agroindustrial Obispo Colombres, Tucumán, Argentina
- Centro Ecuatoriano de Biotecnología y Ambiente (CEBA), Ecuador
- Instituto Cubano de Investigaciones de los Derivados de la Caña de Azúcar (ICIDCA), Cuba
- Cooperativa de producción Agropecuaria 26 de julio. Cuba
- Productor en Overo Pozo, región Chaco Pampeana de la provincia de Tucumán. Argentina

Fecha de inicio

Prevista originalmente: Enero 2018

Real: Septiembre 2018

Fecha de término

Prevista originalmente: Enero 2020

Estimada: Septiembre 2020

Período del informe: (indicar el trimestre y año) Año

Año 2020

2. Progreso en la implementación del proyecto

Estado de los Riesgos en la actividad:

Describir los principales riesgos identificados y las acciones tomadas para controlar/minimizar el riesgo.

Definición del riesgo	Acción	Responsable
<p>Afectaciones en la compra de insumos y equipos, dado el nivel de especialización que se requiere en los procesos biotecnológicos.</p> <p>Aumento de los precios de los equipos en el mercado</p>	<p>Ampliar especificaciones técnicas de la presentación del plan de compra</p> <p>Proponer alternativas de proveedores avalados</p> <p>Planificar para inicios del proyecto los insumos de mayor complejidad</p> <p>Establecer un orden de prioridad de adquisición de equipos e insumos.</p> <p>Chequear mensualmente con la empresa importadora y responsable de logística del ICIDCA</p>	Daysi Dopico
Atrasos en la aplicación y evaluación de los parámetros agronómicos por eventos climatológicos	Definir diferentes metodologías de evaluación y ampliar áreas de aplicación de los biofertilizantes	Yusmila Guevara
Afectación en ejecución de talleres de capacitación inducidos por existir una pandemia provocada por el virus SARS-COV-2.	Intercambios por correos electrónicos y redes sociales	Ana Nelis San Juan

Problemas de implementación:

Describir los principales obstáculos experimentados durante la implementación. Incluir las estrategias o acciones ya ejecutadas para enfrentar estas dificultades.

Obstáculo identificado	Acción
Demora en la aprobación del proyecto por las Instituciones correspondientes y liberación del financiamiento por el PNUD, lo cual provocaron que la primera acción del proyecto se ejecutara en noviembre 2018.	Para garantizar la ejecución del proyecto se desarrollaron tareas con financiamiento de las instituciones participantes.

3. Desempeño del Proyecto – Grado de avance hacia el logro de los resultados

Resultados esperados en el marco de resultados estratégicos PNUD (2018-2020): Fortalecidas las capacidades nacionales para promover soluciones medioambientales innovadoras para el desarrollo sostenible y que a su vez contribuyan a mejorar la calidad de vida de la población.

Línea de servicio del MYFF que se aplica:

4.3 Implementadas, sistematizadas y diseminadas iniciativas comunitarias que aportan soluciones ambientales innovadoras y transfieren tecnologías sostenibles para contribuir a la igualdad de género y la calidad de vida de las poblaciones.

Indicador de resultado:

4.3.1. Puestas en marcha de nuevas iniciativas para lograr incrementos de alimentos más sanos, proponer soluciones ambientales, protección de los suelos y la adaptación al cambio climático.

Meta anual (año): Cumplir punto 1 que se especifica abajo

1. Aislamiento y selección de bacterias endofíticas autóctonas promotoras del crecimiento de los géneros *Azospirillum* y *Gluconacetobacter*, a partir de sus características promotoras del crecimiento vegetal: fijación de nitrógeno, producción de fitohormonas y sideróforos, solubilización de fósforo, entre otras.
2. Desarrollar procedimientos tecnológicos para la producción demostrativa de las bacterias endofíticas, evaluando su comportamiento fisiológico y la estabilidad de los biofertilizantes obtenidos.
3. Aplicaciones en campo de los biofertilizantes obtenidos, evaluando diferentes variables agronómicas en unidades productoras de caña de azúcar y otros cultivos bioenergéticos

Grado de avance en la contribución al resultado corporativo:

- X Cambio Positivo
- Cambio Negativo
- Sin cambios

**Resultado
(Producto)
Previsto en
el Proyecto**

Actividades desarrolladas: (Descripción en base del producto esperado, categoría de actividades y fecha de inicio y finalización)

I. REUNION DE SEGUIMIENTO DEL PROYECTO

Reunión inicial del proyecto con los representantes de Argentina.

Presentación del proyecto y estrategia para su cumplimiento. Fecha: 14 de octubre al 28 de octubre del 2018

En la reunión se encontraban presentes:

MSc. Ana Nelis San Juan Rodríguez -----Coordinador general del Proyecto PGTF Instituto Cubano de Investigaciones de los Derivados de la Caña de Azúcar (ICIDCA, Cuba)

Dra. María Laura Tortora ----- Coordinadora por Argentina del Proyecto PGTF. Estación Experimental Agroindustrial Obispo Colombres (EEAOC), Tucumán.

Lic. María de los Ángeles Núñez, Lic. Micaela Alderete, Ing. Fernanda Leggio----- Investigadores de la sesión de caña de la EEAOC

Invitados

Dr. Aldo Noguera-----Director sesión Biotecnología (EEAOC)

Dr. Carlos Grellet ----- Director Sesión de Caña (EEAOC)

Dr. Atilio Castagnaro ----- Representante del Conicet (EEAOC)



Reunión de coordinadora Argentina Dra. María Laura Tortora y especialista Dr. Luis Araya. septiembre 2019. Presentación del avance del proyecto y análisis de los resultados experimentales.



En la reunión se encontraban presentes:

MSc. Ana Nelis San Juan Rodríguez -----Coordinador general del Proyecto PGTF Instituto Cubano de Investigaciones de los Derivados de la Caña de Azúcar (ICIDCA, Cuba)

Dra. María Laura Tortora ----- Coordinadora por Argentina del Proyecto PGTF. Estación Experimental Agroindustrial Obispo Colombres (EEAOC), Argentina

Dr. Luis Araya ----- Especialista Estación Experimental Agroindustrial Obispo Colombres (EEAOC), Argentina

Arodis Caballero Núñez----- Director general del ICIDCA

Daisy Dopico -----Jefa grupo Desarrollo Bioprocesos Cuba 10. ICIDCA

Marlyn Pérez ----- Investigador y responsable de Calidad de la UEB Bioprocesos Cuba 10. ICIDCA

Juana Pérez ----- Investigadora Instituto Cubano de Investigaciones de la caña de Azúcar. INICA

Mario A. Casas----- Investigadora Instituto Cubano de Investigaciones de la caña de Azúcar. INICA

Entre otros investigadores invitados.

II. Principales resultados del proyecto.

II.1 Entrenamientos teórico prácticos. Metodología de aislamiento y selección de bacterias endofíticas promotoras del crecimiento de los géneros *Azospirillum* y *Gluconacetobacter*, y diseños de procesos de propagación por fermentación sumergida.

El entrenamiento teórico-práctico se centró en la preparación de la estrategia y aprobación de la metodología para el aislamiento y selección de bacterias endofíticas autóctonas promotoras del crecimiento de los géneros *Azospirillum* y *Gluconacetobacter*, a partir de sus características promotoras del crecimiento vegetal: fijación de nitrógeno, producción de fitohormonas y sideróforos, solubilización de fósforo, entre otras.



Además se elaboraron y discutieron los protocolos para la propagación de las bacterias *Azospirillum* y *Gluconacetobacter*, a escala de zaranda, los protocolos incluían el diseño de los medios de cultivos, los parámetros operacionales así como los controles a aplicar en el proceso, se definieron 5 repeticiones y se realizaron ejercicios prácticos con las cepas de referencias.



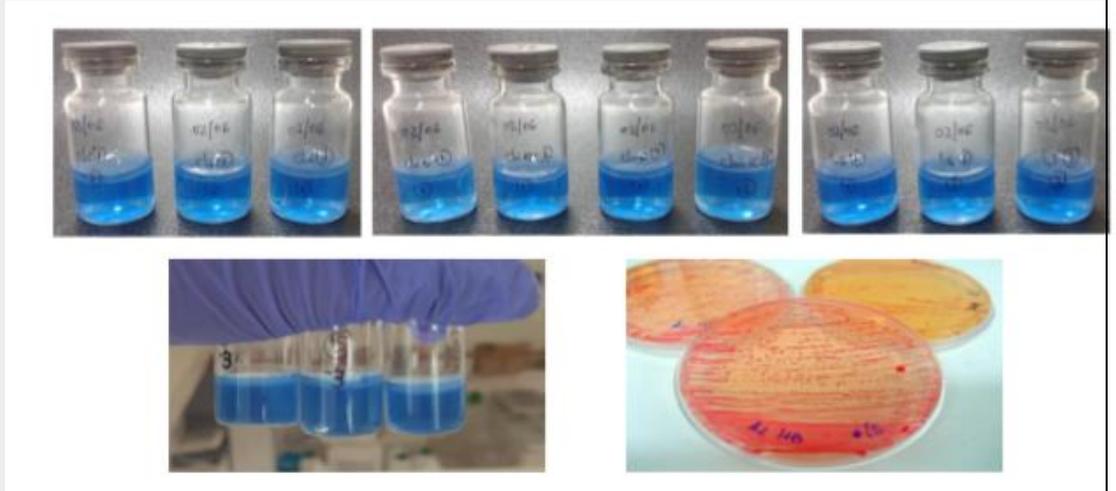
II.2 - Aislamiento, selección y caracterización de bacterias del género *Azospirillum* y *Gluconacetobacter*.

Se aislaron diferentes bacterias fijadoras de nitrógeno que según su caracterización bioquímica serían bacterias pertenecientes al género *Azospirillum* y al género *Gluconacetobacter*. Los aislamientos se realizaron a partir de muestras de hojas, raíces, tallos y suelo de cañaverales de la variedad LCP 85-384 provenientes de Semilleros Registrados, ubicados en fincas de la EEAOC, provincia de Tucumán.

Aislamiento, selección y caracterización de bacterias del género *Azospirillum*

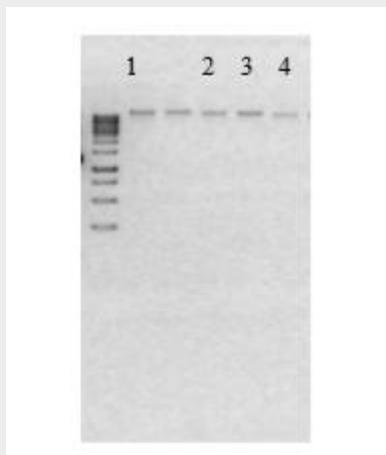
Caracterización bioquímica y molecular de los aislamientos:

Caracterización bioquímica: los aislamientos bacterianos crecieron en forma de película blanca subsuperficial y densa en medio de cultivo NFb semisólido, y colonias pequeñas color rojo escarlata de consistencia seca, bordes irregulares y superficie rugosa en medio de cultivo NFb sólido adicionado con extracto de levadura y Rojo Congo, típico de este microorganismo. Bacilos cortos de forma vibroide y movilidad mediante un flagelo polar al observarlas en el microscopio.

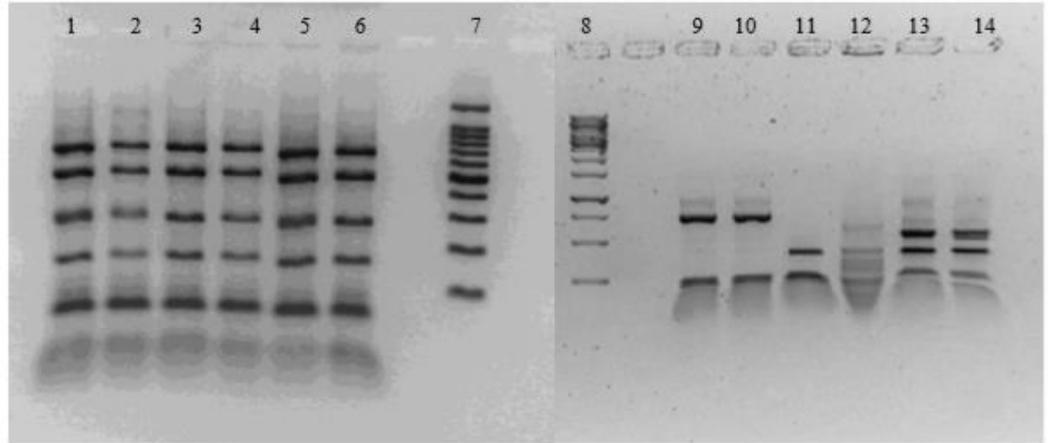


De todos los aislamientos obtenidos, se informan los resultados correspondientes a los seleccionados por ser los mejores promotores del crecimiento: *Azospirillum* AEERe1 (ex ChiE1) y AEERi3 (ex FRI3).

Caracterización molecular: se amplificó por PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa), un fragmento de 1450 pb del gen 16S ADNr, utilizando los cebadores 27f y 1492r (Biodynamics, Argentina). Calle 1: ladder 1 Kb (Thermo), calle 2: cepa de referencia Az39, calle 3: AEERe1 (exChiE1), calle 4: AEERi3 (exFRI3).



A partir del ADNr 16S, se realizó la digestión con la enzima de restricción AluI (Thermo Scientific, USA), comparando los perfiles obtenidos con la cepa de referencia: *Azospirillum brasilense* Az39.

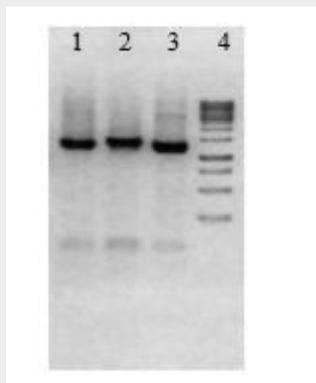


Digestión con enzima AluI por electroforesis en gel de agarosa. Calle 1: A. brasilense Az39, calle 2: AEERe1 (exChiE1), calle 6: A. brasilense D166; calle 7: Marcador 100 pb (Promega); calle 8: Marcador 100 pb (Promega), calle 13: A. brasilense Az39, calle 14: AEERi3 (exFRI3).

Los perfiles de restricción obtenidos para las cepas AEERe1 y AEERi3 fueron idénticos al de la cepa de referencia A. brasilense Az39 por lo que éstas cepas corresponden al género Azospirillum.

Análisis de sus características promotoras del crecimiento:

1.- Fijación biológica de nitrógeno: se amplificó por PCR un fragmento de 710 pb del gen nifD de la nitrogenasa.



Calle 1: cepa de referencia A. brasilense Az39, calle 2: AEERi3 (exFRI3), calle 3: AEERe1 (exChiE1), calle 4: ladder 1 Kb (Thermo).

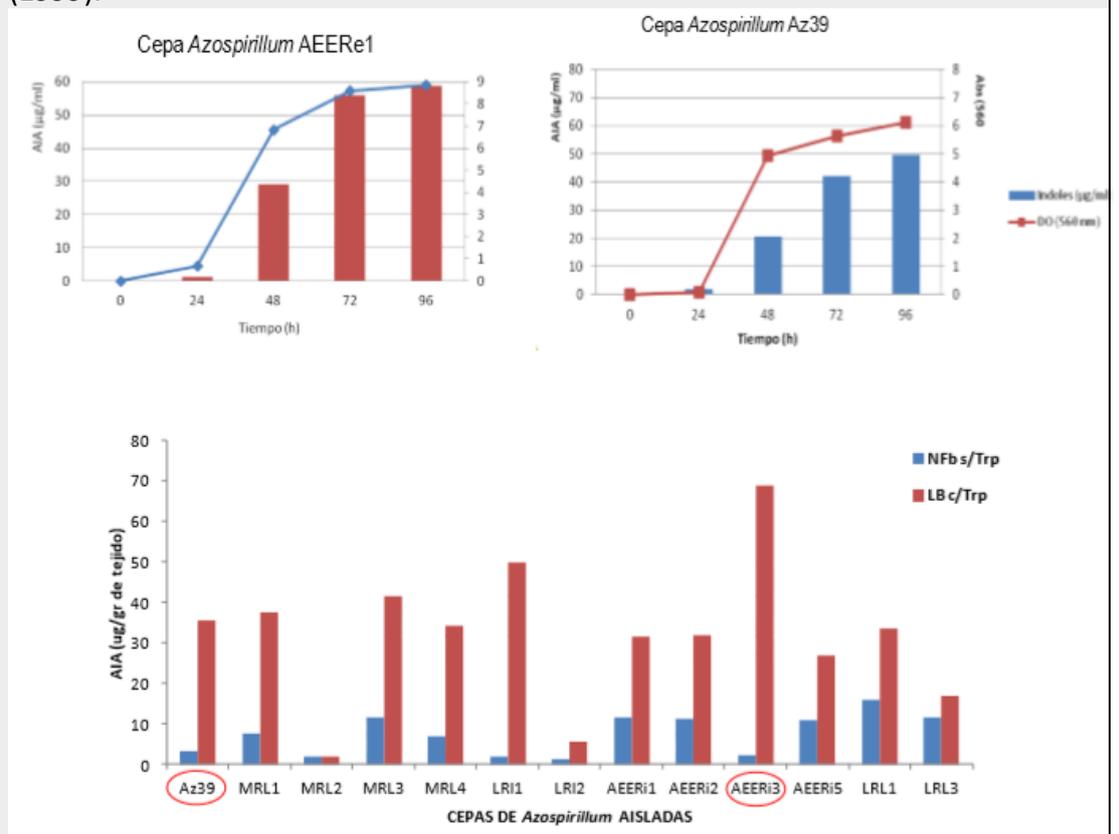
Las cepas seleccionadas AEERi3 y AEERe1 presentaron el gen nifD de la nitrogenasa y por lo tanto capacidad potencial para fijar nitrógeno.

Solubilización de fósforo: Se utilizó la técnica semicuantitativa



La cepa AEERi3 presentó mayores halos de solubilización de fósforo que la cepa de referencia Az39. A diferencia del resto de los aislamientos evaluados, la cepa AEERe1 no presentó halos de solubilización de fósforo.

Producción de indoles: se analizó la producción de AIA durante el crecimiento de las bacterias AAERe1, AAERi3 y Az39 cultivadas con agitación en presencia y ausencia de triptófano, siguiendo el método colorimétrico descrito por Glickmann y Dessaux (1999).

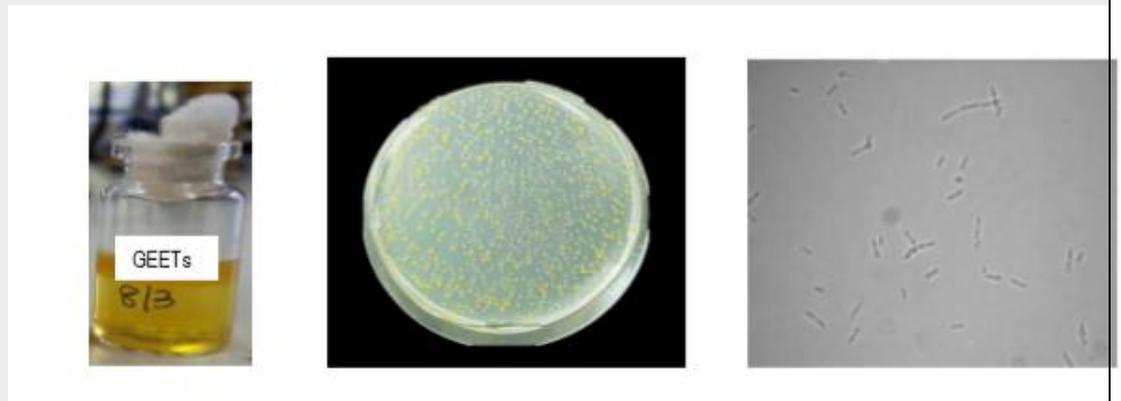


Los dos aislamientos seleccionados *Azospirillum* AEERe1 y AEERi3 presentaron mayor producción de AIA que la cepa de referencia *Azospirillum* Az39.

Aislamiento de bacterias del género *Gluconacetobacter*

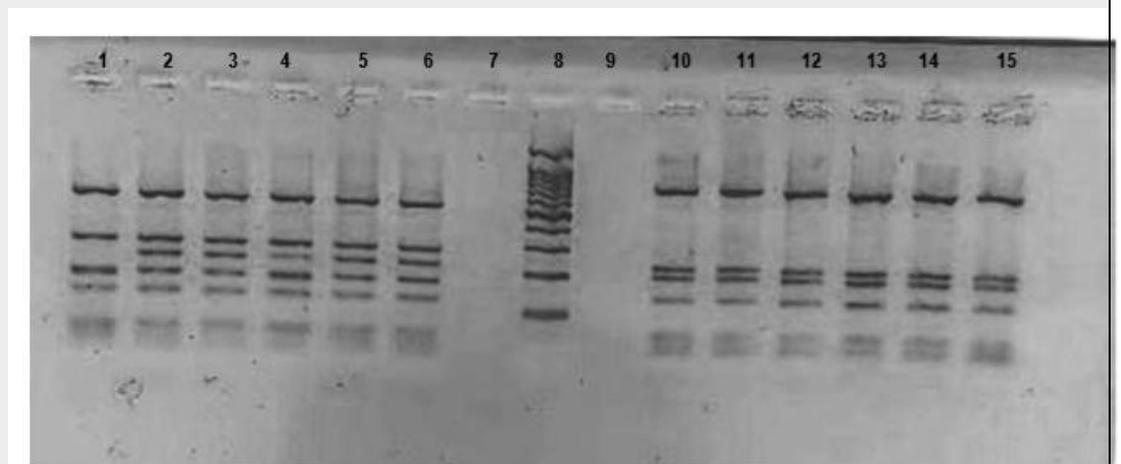
Caracterización bioquímica y molecular de los aislamientos:

Caracterización bioquímica: los aislamientos bacterianos crecieron en forma de película superficial densa de color amarillo, típica de *Gluconacetobacter*, en medio LGI-P semisólido y colonias planas e irregulares de color naranja intenso pequeñas en medio de cultivo LGI-P sólido adicionado con extracto de levadura como fuente nitrogenada, típico de este microorganismo. Bacilos cortos de forma vibroide y movilidad mediante flagelos polares al observarlas en el microscopio.



De todos los aislamientos obtenidos, se informan los resultados correspondientes a los seleccionados por ser los mejores promotores del crecimiento: *Gluconacetobacter* GEETA (ex Tart) GEEA (ex Agro) y GEETs (ex MTs) (calle 5)

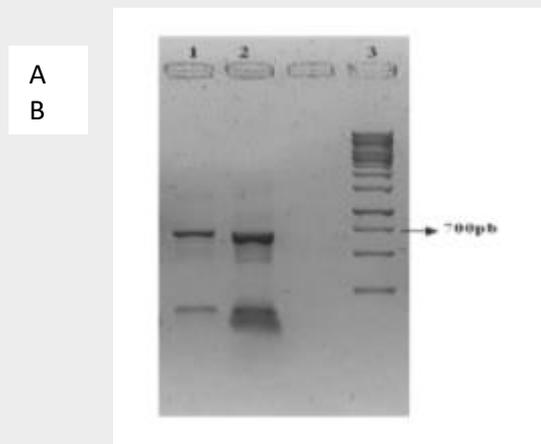
Caracterización molecular: se llevó a cabo por amplificación por PCR de un fragmento del gen 16S ADN ribosomal utilizando los cebadores 27f y 1492r (Biodynamics, Argentina), y posterior digestión durante 8 hs a 37°C con las enzimas AluI y BsuRI, ambas fueron inactivadas a 80°C durante 20 minutos (ThermoScientific, USA). Los fragmentos obtenidos de las diferentes cepas en estudio se sembraron en un gel de agarosa al 2 % (p/v) a fin de comparar los perfiles de restricción con los de la cepa de referencia *G. diazotrophicus* PAL5.



Perfil de electroforesis de los fragmentos obtenidos luego de la restricción del ADNr 16S con las enzimas de restricción BsuRI y AluI. Los patrones de restricción para BsuRI corresponden a la cepa GEETA (ex Tart) (calle 1), GEEA (ex Agro) (calle 2), GEETs (ex MTs) (calle 5) y la cepa control PAL5 (calle 6). La calle 8 corresponde al marcador de peso molecular de 100 pb (Thermo Scientific). Los patrones de restricción para AluI corresponden a la cepa control PAL5 (calle 10), GEETs (ex MTs) (calle 11), GEEA (ex Agro) (calle 14) y la cepa GEETA (ex Tart) (calle 15).

Análisis de sus características promotoras del crecimiento:

Se evaluó la capacidad potencial de fijar nitrógeno del aislamiento seleccionado GEETs (ex MTs) por amplificación de un fragmento de 700 pb del gen nifD de la nitrogenasa.



Calle 1: cepa GEETs (ex MTs) y calle 2: la cepa control *G. diazotrophicus* PAL5. La calle 3 corresponde al marcador de peso molecular de 100 pb (Thermo Scientific).

Al presentar el gen nifD de la nitrogenasa, la cepa GEETs tiene capacidad potencial para realizar la fijación biológica de nitrógeno.

II.3 Desarrollar procedimientos tecnológicos para la producción demostrativa de las bacterias endofíticas, evaluando su comportamiento fisiológico y la estabilidad de los biofertilizantes obtenidos.

Se aprobó la utilización de un medio industrial compuesto por melaza de caña, licor de fructosa y levadura torula hidrolizada, subproductos de la industria azucarera para la formulación de los medios de cultivo para el crecimiento de las cepas de *Azospirillum* y *Gluconacetobacter*.

Evaluación del crecimiento de las cepas de *Azospirillum* seleccionadas, utilizando el medio de cultivo diseñado para la producción industrial:

Reactivos	Concentración
Fosfato de Amonio dibásico (NH ₄) ₂ HPO ₄	1.78

Sulfato de Magnesio $MgSO_4$	0.2
Cloruro de potasio KCl	0.1
Licor de fructosa	12 g/l
Levadura Torula	1 g/l de Nt



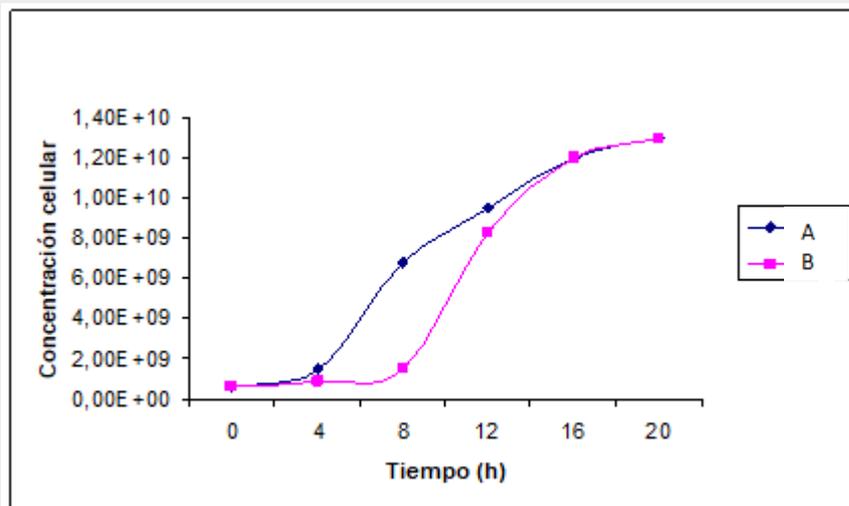
II.3 a) Crecimiento de las cepas seleccionadas de *Azospirillum* para la formulación de los biofertilizantes

Experimentos realizados con el aporte de Cuba, en la planta piloto de la UEB Bioprocesos Cuba 10, del ICIDCA.



Fermentador de 42 L
INFORST HT Techfors-s

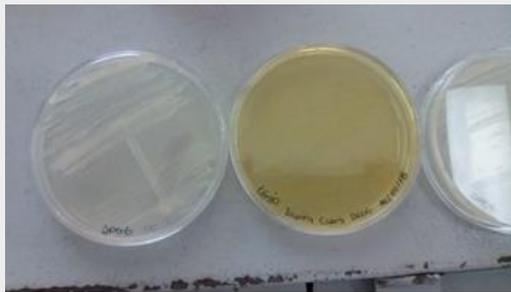




Cinética de crecimiento en fermentador de 42 litros de las cepas seleccionadas para la formulación de los biofertilizantes A: *Azospirillum brasilenses* 8I (Cuba) y Cepa : *Azospirillum brasilenses* AEERi3 Argentina

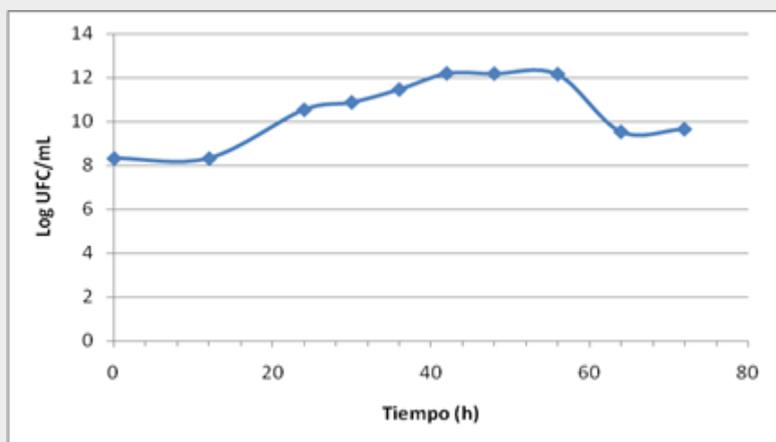
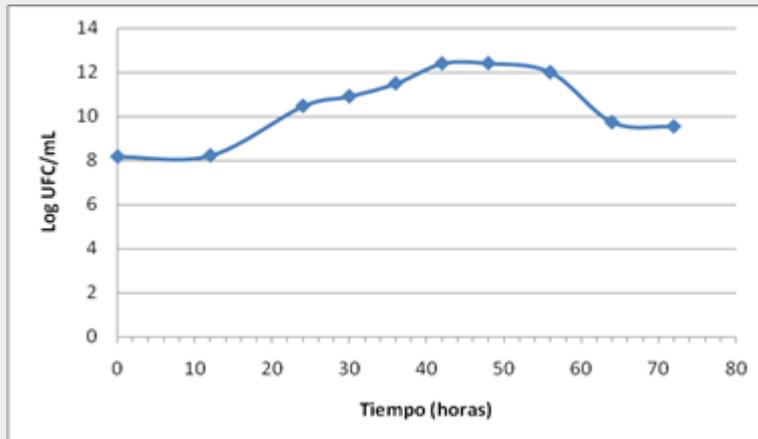
Los experimentos realizados demostraron que las cepas seleccionadas de *Azospirillum brasilenses* para la formulación de los biofertilizantes presentaron un buen crecimiento en el medio propuesto para su producción, lográndose concentraciones en el orden de 10^{10} UFC/mL

II.3 b) Evaluación del crecimiento de las cepas seleccionadas de *Gluconacetobacter diazotrophicus* con medio industrial diseñado.



Para la preparación de los pre-cultivos se partió de tubos con cepa D166 (Cuba) y GEETs (Argentina) conservada en medio LGI-M sólido. Se realizó la propagación en erlenmeyers de 500 mL de volumen total conteniendo 100 mL de medio de cultivo LGI-P líquido, (Stephan y col., 1991) este medio se diferencia del LGI-M en la concentración de extracto de levadura, utilizándose 0,05 g.L-1. Los mismos fueron incubados en zaranda rotatoria termostata INFORS HT Multitron (Figura 1), a 180 rev.min-1 y temperatura de 30°C por un período de 48 horas.

Los experimentos se realizaron en el fermentador de 42 L de volumen total, marca INFORST Techfors-s, con un volumen efectivo de 30 L y tres impulsores con diámetro de 89 mm. Se trabajó con 25 L de volumen efectivo. La agitación se fijó a 290 rev.min⁻¹ y la aireación de 12,5 L.min⁻¹, estos valores se tomaron teniendo en cuenta experimentos preliminares. La temperatura de trabajo fue de 30°C. El pH se ajustó inicialmente de 5,5-6,0 y se dejó libre durante todo el proceso. La relación de inoculación fue del 10%. Se evaluó la cinética de crecimiento del proceso mediante el conteo de viables y se determinó el comportamiento del pH.



B

Cinética de crecimiento de las cepas *Gluconacetobacter diazotrophicus* A: D166 (Cuba) y B: GEETs (Argentina) en medio miel final de caña, fosfato de amonio y levadura torula (medio simplificado), en fermentador de 42 L a 290 rev.min⁻¹, aireación 12,5 L.min⁻¹ y temperatura de 30°C.

Las figuras demuestran un comportamiento similar de la cinética de crecimiento de ambas cepas de *Gluconacetobacter diazotrophicus*. Las velocidades específicas de crecimiento (μ) calculadas en la fase logarítmica entre las horas 12 y 24, son muy similares, siendo de 0,186 h⁻¹ y 0,184 h⁻¹

Es de especial interés el comportamiento del crecimiento celular para ambas cepas, pero los valores máximos alcanzados de viabilidad se encuentran por encima de

1.10¹² UFC.mL-1. Los resultados obtenidos están en correspondencia con lo esperado al utilizar miel final de caña como fuente de carbono. Este subproducto de la industria azucarera aporta al medio un elevado contenido de minerales y otros nutrientes que facilitaron la multiplicación celular, alcanzando titulaciones no reportadas anteriormente en la literatura. El suplemento del medio con un contenido de ión Amonio de 10 mM también contribuyó a estos resultados, inhibiendo la fijación biológica de Nitrógeno y permitiendo la utilización de la energía metabólica en el proceso de multiplicación celular.



II.4 Aplicaciones en campo de los biofertilizantes obtenidos, evaluando diferentes variables agronómicas en unidades productoras de caña de azúcar y otros cultivos bioenergéticos.

Con la colaboración del Centro Ecuatoriano de Biotecnología y Ambiente (CEBA), Ecuador, se estudiaron cuatro biofertilizantes líquidos obtenidos de las cepas de *Azospirillum* y *Gluconoacetobacter* seleccionadas. La fase in vitro del experimento constó de 1 evaluaciones de los biofertilizantes en caña de azúcar y en sorgo, a nivel de invernadero, sobre las cuales se realizaron aplicaciones foliares de los biofertilizantes líquidos más fertilizantes convencionales, en diferentes concentraciones (tratamientos), por un período de ocho semanas. Se realizaron dos inoculaciones, la primera a la siembra, añadiendo 20 mL de la suspensión de bacterias (entre 600 y 900 millones de células mL-1) a cada uno de los potes. La segunda inoculación se realizó 35 días después de la siembra, aplicando 5 mL de la suspensión en la base de cada una de las plantas (en este caso la suspensión tenía una concentración aproximada a 300 millones de células mL-1). Los resultados obtenidos para el contenido de nitrógeno, peso fresco del follaje, el peso seco del follaje y radical en cada uno de los tratamientos, arrojaron diferencias significativas respecto al control, demostrándose la efectividad del uso de los biofertilizantes en la sustitución parcial de los fertilizantes químicos.



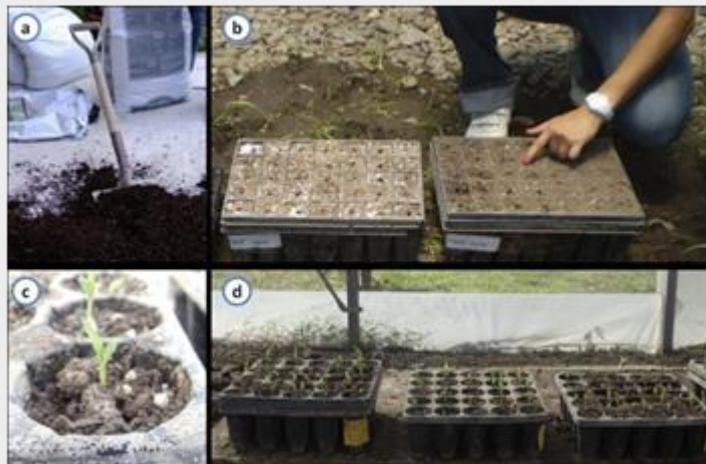
II.4a) Evaluación de la capacidad del aislado de *Azospirillum* para mejorar el crecimiento de sorgo azucarado

Material Vegetal: Se trabajó con semillas híbridas de sorgo Argensil 165 BIO, por ser el primer híbrido argentino destinado a la obtención de biocombustible. Se caracteriza por tener un alto contenido de sólidos solubles totales en el tallo (Brix).

Microorganismos: Se trabajó con la cepa 8I de *Azospirillum brasilense*.

Inoculación: las semillas de sorgo se inocularon por inmersión en la suspensión bacteriana de concentración 10^9 UFC/ml.

Las semillas inoculadas y sus respectivos testigos sin inocular se dejaron secar sobre papel absorbente estéril a temperatura ambiente durante 15 min. Luego, se sembraron en almácigos de 12 pocillos (repeticiones), colocando una semilla por pocillo, a una profundidad de 2 a 4 cm desde la superficie (Medina et al., 2012). Los almácigos se conservaron en el invernáculo de la EEAOC, bajo condiciones controladas de temperatura (35°C) y humedad (90%).



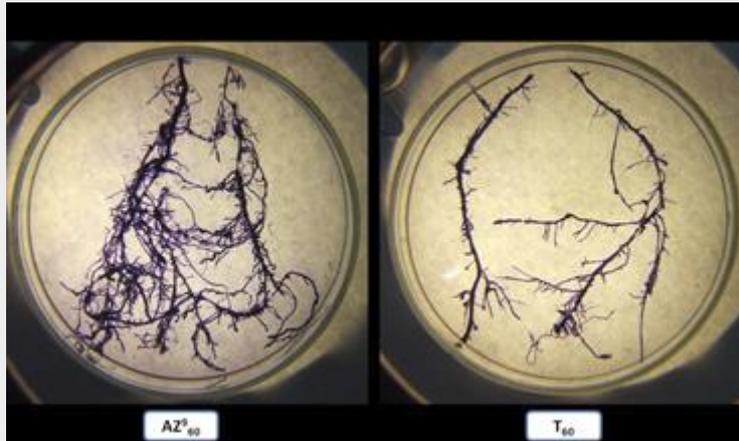
Esquema de la siembra de las semillas de sorgo inoculadas. (a) Preparación del sustrato, (b) siembra de las semillas inoculadas en almácigos, y (c), (d) crecimiento de los plantines en el invernáculo de la EEAOC

Ensayos en invernáculo

Azospirillum brasilense 8I mejoro la germinación, aceleró el estado fenológico de las plantas por un aumento en el número de hojas verdes (estado fenológico) e incremento del crecimiento aéreo y radicular del sorgo azucarado en ensayos realizados en invernáculo.



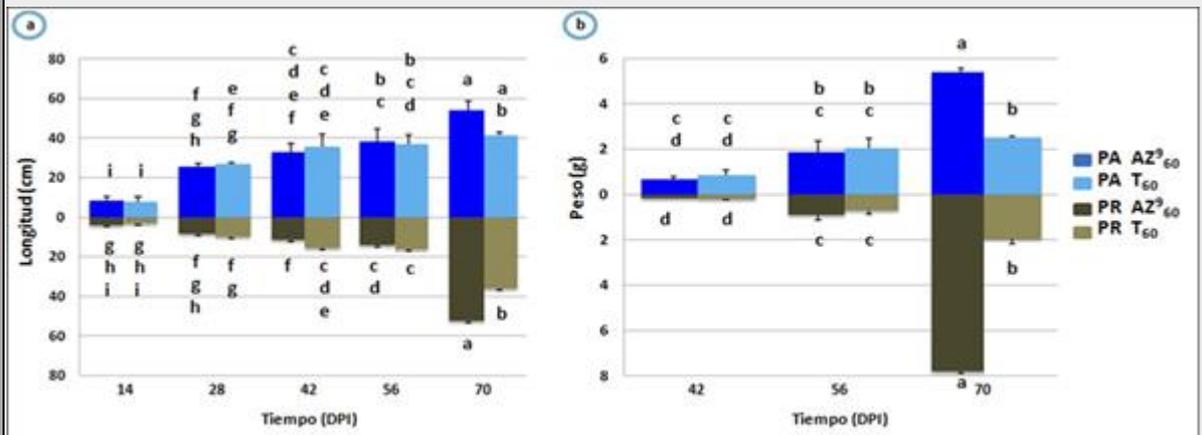
Aspecto de las plantas de sorgo inoculadas con *Azospirillum* cepa 8I en comparación con las plantas sin inocular T₆₀, evaluado a los 70 días posteriores a la inoculación.



Desarrollo de pelos radiculares y raíces secundarias de las plantas de sorgo inoculadas con *Azospirillum* cepa 8I (AZ⁹⁶⁰), en comparación con las plantas sin inocular T₆₀, evaluado a los 70 DPI.

Tratamiento	Número de hojas verdes				
	14 DPI	28 DPI	42 DPI	56 DPI	70 DPI
AZ ⁹⁶⁰	2	4	5	6	8
T ₆₀	2	4	5	6	6

Evaluación del estado fenológico de las plantas inoculadas pertenecientes al tratamiento AZ⁹⁶⁰ en comparación con las plantas sin inocular. (Error ± 1).



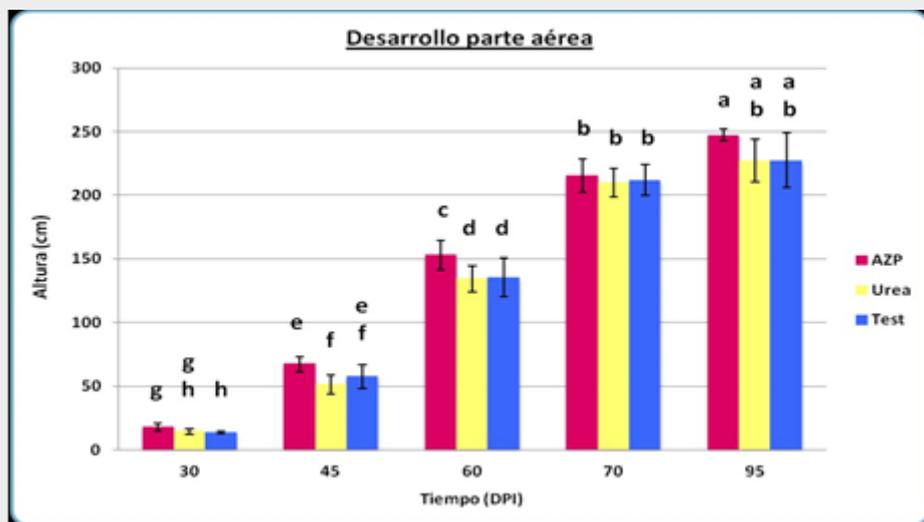
(a) Longitud y (b) peso fresco de la parte aérea y radicular de las plantas inoculadas con *Azospirillum* 8I AZ⁹⁶⁰ con respecto a las plantas testigo T₆₀. Las barras en azul corresponden a los valores obtenidos para la parte aérea y las barras en marrón corresponden a los obtenidos para la porción radicular. Letras distintas representan valores estadísticamente diferentes (Análisis de ANOVA con la Prueba de Tukey, p<0,05).



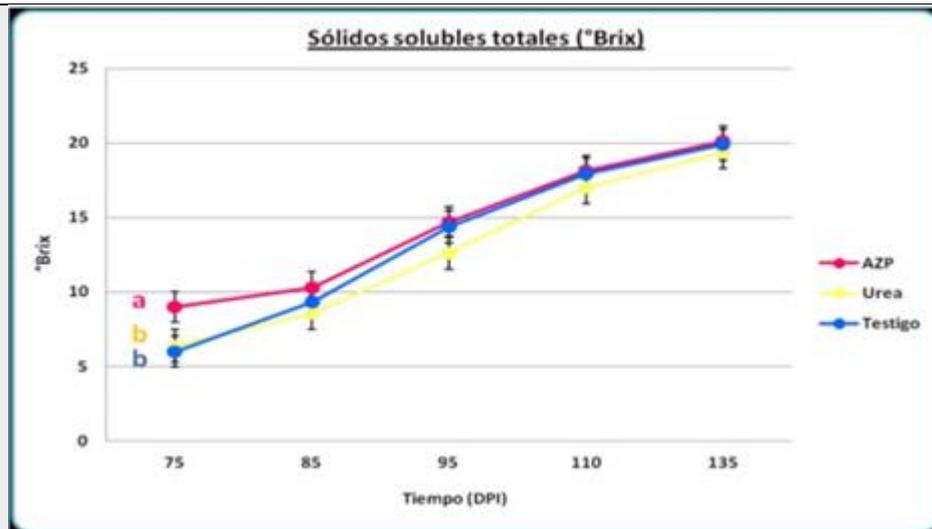
Aspecto de las plantas inoculadas con el biofertilizante AZP en comparación con las plantas testigo sin inocular, evaluado a los 75 DPI.

Evaluación de la capacidad de la cepa *Azospirillum* 8I de mejorar la productividad bioenergética del cultivo en ensayos preliminares realizados a campo

La capacidad de mejorar la productividad bioenergética del cultivo de sorgo azucarado, se evaluó en microparcelas ubicadas en lotes experimentales de la EEAOC, mediante el análisis de parámetros de crecimiento y calidad.



Altura de las plantas de sorgo azucarado evaluada a los 30, 45, 60, 70 y 95 DPI. Las barras en rojo corresponden a las plantas inoculadas con la cepa de *A. brasilense*. Las barras en amarillo corresponden a las plantas fertilizadas con Urea, y las barras en azul corresponden a las plantas testigo. Letras distintas representan valores estadísticamente diferentes (Análisis de ANOVA con la Prueba de Tukey, $p < 0,05$).



II.4 b) Se evaluó el efecto del biofertilizante obtenido a partir de la cepa *Azospirillum brasilense* 81 como complemento de la fertilización nitrogenada sintética.

Sitio experimental y diseño experimental El sitio de ensayo fue establecido en el lote experimental Overo Pozo, Departamento Burrucacú, situado en la región Chaco Pampeana de la provincia de Tucumán. La variedad implantada es la variedad LCP 85-384, soca 5. El suelo del lote presenta textura franco limosa, con 2,3% de materia orgánica, el pH es de 6,6, el contenido de Fósforo fue de 28,5 ppm y la salinidad de 0,2 dS/m. El manejo del campo experimental es convencional, con residuos de cosecha como cobertura. Los tratamientos que se evaluaron en el experimento fueron acomodados en un diseño experimental de 3 bloques al azar con 3 repeticiones, el tamaño de las parcelas fueron de 5 surcos distanciados a 1,60 m y de 25 m de largo aproximadamente. Los tratamientos evaluados fueron los siguientes: 1. Testigo absoluto (sin aplicar) 2. Nitrato de amonio calcáreo 125 Kg/ha (34 Kg N/ha) (CAN) 3. Nitrato de amonio calcáreo 125 Kg/ha (34 Kg N/ha) + NITROFIX 40 l/ha

La aplicación del fertilizante sólido se realizó con un equipo fertilizador neumático de 5 surcos. La aplicación del CAN fue superficial sobre la línea del cultivo. La aplicación de los fertilizantes foliares se realizó con mochilas manuales, asperjando 800 cm³ por parcela, a una concentración del 40% del biofertilizante base *Azospirillum*.

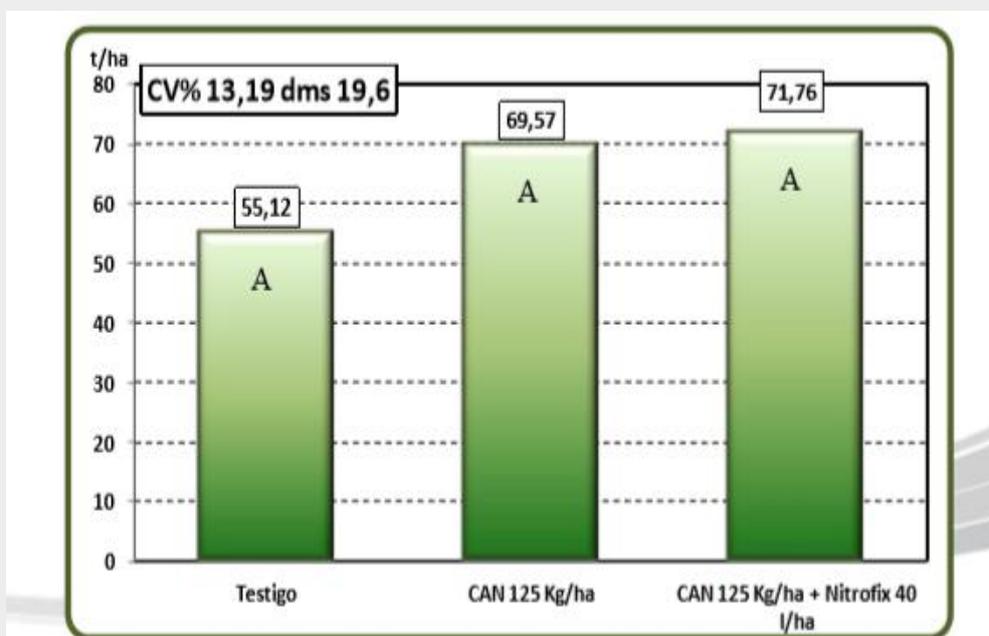
En el momento de la cosecha se evaluaron los parámetros correspondientes a los componentes del rendimiento, tales como población y peso, con estos parámetros se estimó el rendimiento cultural. Los datos obtenidos fueron analizados por el ANOVA, empleando el Test de Fisher, con 5% de significancia.

La aplicación de *Azospirillum brasilense* cepa 81 sobre CAN 125 Kg/ha presentó un mayor número de tallos con respecto a los restantes tratamientos. Aunque, no se observaron diferencias significativas en el análisis de este parámetro. (Tabla 1) Peso de tallos: CAN 125 Kg/ha fue el tratamiento con mayor peso, presentando diferencias significativas con relación al Testigo. (Tabla)

Tratamiento	Población (tallos/m)	Fisher 5%	Peso (Kg)	Fisher 5%
Testigo (sin fertilizar)	19,17	A	0,46	B
CAN 125 Kg/ha	18,72	A	0,60	A
CAN 125 Kg/ha + NITROFIX 40 l/ha	21,56	A	0,53	AB

CV	6,57	7,69
dms	2,95	0,09

Rendimiento Cultural: El biofertilizante obtenido se aplicó a razón de 40 l/ha como complemento de CAN 125 Kg/ha presentó los máximos valores de producción de caña de azúcar, generando un incremento de 16,6 t/ha (30,2%) sobre el Testigo (sin fertilizante) y 2,2 t/ha (3,2%) sobre CAN 125 Kg/ha. Los valores que presentaron los diferentes tratamientos, no presentaron diferencias estadísticamente significativas.



Análisis estadístico de rendimiento cultural, LCP 85-384, Burruyacú, Tucumán

La aplicación del biofertilizante obtenido a base de la cepa 8l, presentó incremento de rendimientos importantes cuando se comparó al tratamiento sin fertilizar, mientras que el aumento generado sobre el fertilizante sintético (Nitrato de amonio calcáreo) está dentro de los valores normales de incremento que se obtienen en la aplicación de los biofertilizantes. La aplicación del biofertilizante incidió con mayor efecto en el número de tallos molibles a cosecha.

II.4 c) Ensayo de aplicación del inoculante *Gluconacetobacter* en el cultivo de la caña de azúcar (variedad 8656)

El experimento se desarrolló en condiciones de secano a campo abierto en áreas del Banco de Semillas de la estación experimental ETICA, perteneciente al Instituto Cubano de Investigaciones de la Caña de Azúcar. INICA. La concentración celular fue de 8×10^9 UFC.mL⁻¹ de *Gluconacetobacter* (cepa 166 Cuba). La inoculación del producto se realizó en horas de la tarde por el método de aspersión, con ayuda de una mochila de 16 litros.

Se utilizó un diseño experimental de bloques al azar (parcelas de 24 m²), con 3 réplicas y 3 tratamientos por réplica.

Tratamientos empleados en la aplicación de *Gluconacetobacter*

Testigo	0 L.ha ⁻¹	1
Réplica I	T – 1 (2 Lha ⁻¹)	2
	T – 2 (5 Lha ⁻¹)	3
	T – 3 (10Lha ⁻¹)	4
Réplica II	T – 1 (2 Lha ⁻¹)	5
	T – 2 (5 Lha ⁻¹)	6
	T – 3 (10Lha ⁻¹)	7
Réplica III	T – 1 (2 Lha ⁻¹)	8
	T – 2 (5 Lha ⁻¹)	9
	T – 3 (10Lha ⁻¹)	10

En la Tabla se refleja el resultado alcanzado con los 3 tratamientos evaluados y el Testigo, donde no se observaron diferencias entre los indicadores de altura de la planta y No de hojas activas por planta. Sin embargo, en el T-3 (10 Lha⁻¹) se observa el mayor valor para el indicador de diámetro del tallo y número de tallos con respecto al T-1 (2Lha⁻¹) y al T-2 (5 Lha⁻¹), así como con respecto al testigo.

Efecto de la aplicación de *Gluconacetobacter diazotrophicus* sobre el cultivo de la caña de azúcar. Comparación de medias.

Variantes	X Alt/planta (cm)	X No/ hojas (u)	X Diám/ tallo (cm)	X No Tallos en 10 (m) lineales
Testigo	1,91	9,5	2,4	103
T-1 (2 Lha ⁻¹)	1,90	9,4	2,6	107,6
T-2 (5 Lha ⁻¹)	1,91	9,6	2,6	109,6
T-3 (10 Lha ⁻¹)	1,90	9,4	2,7	112,3

- La inoculación de *Gluconacetobacter diazotrophicus* con la dosis 10 L.ha⁻¹ permite el incremento del diámetro del tallo y el número de tallos, en el primer corte evaluativo a los 6 meses de aplicada la bacteria.

Estudio de diferentes dosis de aplicación de *Gluconacetobacter diazotrophicus* y su efecto sobre variables agronómicas de desarrollo en el cultivo de caña de azúcar en la ETICA Villa Clara.

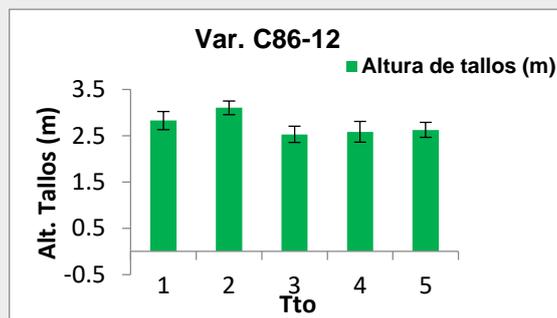
Ubicación: Bloque experimental Estación Territorial de Investigaciones de la Caña de Azúcar (ETICA Villa Clara).

Concentración Biofertilizante: $4,9 \times 10^9$ ufc/ml

Descripción de los tratamientos

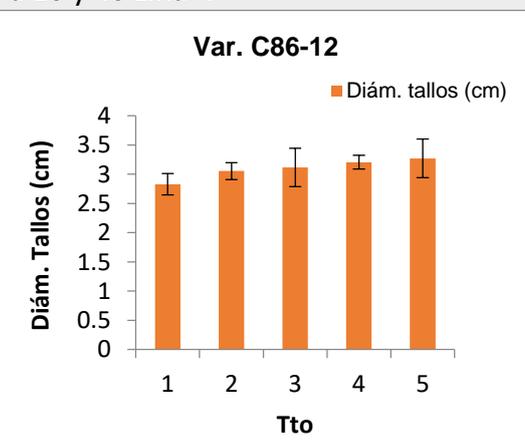
#	Kg de NPK/ha	<i>Gluconacetobacter diazotrophicus</i> (L ha ⁻¹)	Biofertilizante (mL)
I	N ₀ P ₀ K ₀	0	0
II	N ₁₂₀ P ₀ K ₁₂₀	30	96
III	N ₁₂₀ P ₂₅ K ₁₂₀	20	72
IV	N ₁₂₀ P ₅₀ K ₁₂₀	10	48
V	N ₁₂₀ P ₇₅ K ₁₂₀	0	0
VI	N ₁₂₀ P ₂₀₀ K ₁₂₀	40	120
Total			336

En las Figuras se pueden apreciar que al término de la cosecha existen diferencias significativas entre los tratamientos en cuanto a la altura de los tallos, los tratamientos 2 y 6 alcanzan los mejores resultados para esta variable agronómica seguida del tratamiento 4 con respecto al testigo.

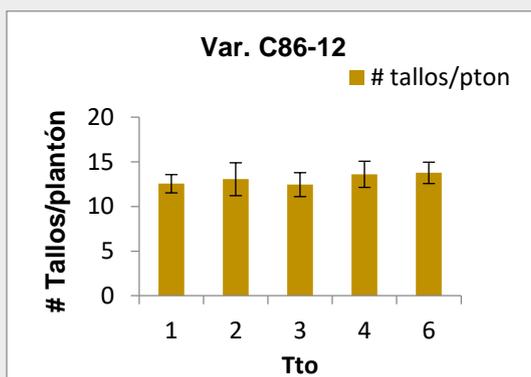


Altura de las plantas de caña de azúcar de los diferentes tratamientos durante el tiempo de cultivo. Barras verticales indican DS, para $p < 0.05$

En las Figuras se observan diferencias significativas entre los tratamientos en las variables agronómicas: diámetro de tallos y número de tallos/plantón, en este caso los tratamientos 4 y 6 alcanzan los mejores resultados en comparación con el testigo, las dosis corresponden a 10 y 40 L.ha⁻¹.

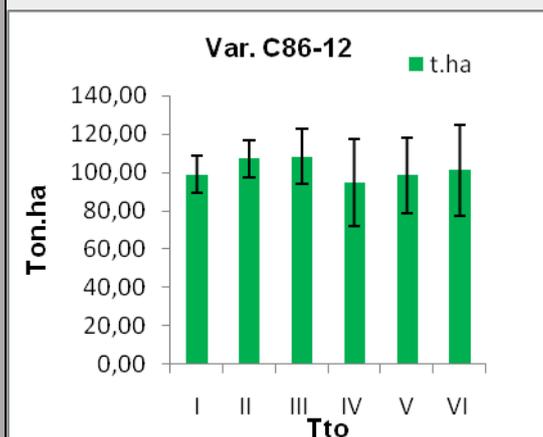


Diámetro de tallos de las plantas de caña de azúcar de los diferentes tratamientos durante el tiempo de cultivo. Barras verticales indican DS, para $p < 0.05$



Número de tallos por plantón de caña de azúcar de los diferentes tratamientos durante el tiempo de cultivo. Barras verticales indican DS, para $p < 0.05$

Los mejores resultados se obtienen con los tratamientos II y III, utilizando 0 fósforo y una dosis de 30 L/ha y 25 Kg de fósforo y 20 L/ha del biofertilizante base *Gluconacetobacter diazotrophicus*, respectivamente y con estos tratamientos se logran incrementar entre 8 y 9 t/ha respecto al testigo.



Rendimiento en Ton de caña de azúcar por hectáreas de los diferentes tratamientos durante el tiempo de cultivo. Barras verticales indican DS, para $p < 0.05$

Este microorganismo tiene grandes atractivos desde el punto de vista agronómico, pues libera hasta el 50% del nitrógeno transformado mediante la fijación biológica y produce sustancias promotoras del crecimiento vegetal, fundamentalmente ácido indol acético. Se conoce el efecto del AIA en la formación de los dominios apicales, la diferenciación vascular y el desarrollo de los órganos del cultivo.

El uso del biofertilizante a partir de la bacteria *Gluconacetobacter diazotrophicus* puede ser un complemento viable para la fertilización nitrogenada y fosforada en caña de azúcar permitiendo obtener buenos rendimientos culturales y fabriles.

___* De ser necesario incorporar nuevas tablas según el número de resultados previstos en el proyecto

4. Información financiera preliminar

(Esta información se considera preliminar hasta la emisión de los CDR, que ofrecerán la información financiera oficial del cierre del año)

Source of Funds	TFPG
Total Budget, USD	23 000, 00
Budget (year), USD	-
Implementation (year), USD	-
Implementation total , USD	22866.00
% Implementation,	99.42%
Falta por ejecutar, USD	-

5. Oportunidades para difundir información

(Las oportunidades para difundir información se refieren a: materiales divulgativos en general, como (libros, artículos, plegables, afiches, almanaques, artículos de prensa, publicaciones, documentos de sistematización de experiencias, sitios web, programas de radio/TV, exposiciones, etc.

Describir brevemente las acciones para la difusión de información realizadas durante el año:

Actividades de divulgación de resultados:

- a) Sitio del proyecto dentro de la página WEB del ICIDCA, mostrando actividades realizadas www.icidca.cu/ "Utilización de bacterias promotoras del crecimiento como biofertilizantes para incrementar la productividad del cultivo de la caña de azúcar y otros cultivos bioenergéticos"
- b) Se impartió la conferencia: "Potencialidades para el desarrollo de un biofertilizante a partir de la bacteria *Gluconacetobacter diazotrophicus* para la caña de azúcar y otros cultivos".





c) Trabajo de diploma en opción al título de ingeniera en procesos agroindustriales Universidad Agraria de la Habana “Fructuoso Rodríguez Pérez” Diseño de un medio de cultivo industrial para la producción de un biofertilizante base *Gluconacetobacter diazotrophicus*. Nelvys Miró Frutos

d) DIVER 2019, La Habana, Cuba: Producción de nuevos biofertilizantes en la planta de bioproductos de la UEB Bioprocesos Cuba 10. Estudio de oportunidad. San Juan, A.N, Salerno, M., Dopico, D., julio Gómez, E., Pérez, M., Guevara, Y. Estupiñan. ICIDCA

d) Asociación de técnicos azucareros de México (ATAM). Participación en XLI Convención y EXPOATAM 2019. Veracruz, México: Desarrollo de biofertilizantes a partir de las bacterias *Gluconacetobacter diazotrophicus* para la caña de azúcar y otros cultivos. Ana Nelis San Juan, Arodís Caballero Nuñez, *María Laura Tortora *Estación Experimental Agroindustrial Obispo Colombres (EEAOC), Tucumán. Argentina



e) Presentación de la Conferencia Avances en la aplicación de biofertilizantes en el cultivo de caña de azúcar en la provincia Tucuman, Argentina en el Instituto Cubano de Investigaciones de la Caña de azúcar. INICA. Dra. María Laura Tortora Estación Experimental Agroindustrial Obispo Colombres (EEAOC), Tucumán. Argentina.



d) Participación evento Bioprocess 2019. Obtención de un biofertilizante a partir de la bacteria *Gluconacetobacter diazotrophicus*. Ana Nelis San Juan, Yusmila Guevara, Marlyn Pérez, Daisy Dopico, Vivian León, Reinaldo Acosta, Natividad Oliva.

6. Lecciones aprendidas

(Las lecciones aprendidas se refieren a aquellos aprendizajes, positivos y negativos, basados en la experiencia, relativos a formas de resolver problemas y/o maneras de llevar adelante actividades que puedan servir a otros actores en procesos similares. Las lecciones aprendidas del ITP podrán servir como insumo para las evaluaciones de proyecto así como para compartir con los demás proyectos que se implementan en conjunto con el Gobierno.)

Describir brevemente las lecciones aprendidas durante el año:

1. A pesar de que se ha incrementado el uso de los biofertilizantes en la agricultura, aún es insuficiente el conocimiento de los productores, los proyectos deben incluir más actividades de capacitación y de demostración de las ventajas y el beneficio de aplicar estos productos, no solo para obtener las cosechas, sino para lograr alimentos más sanos.
2. Promover la divulgación de los resultados del proyecto en otros países de la región, que permita su implementación y la formación de otras alianzas para el desarrollo de tema.
3. Crear grupos multidisciplinarios en las empresas contribuye a garantizar la sostenibilidad de la actividad.

7. Líneas de trabajo para el mejoramiento del desempeño

(Describir las estrategias, acciones y soluciones previstas para enfrentar los problemas identificados, utilizar las lecciones aprendidas, capitalizar los resultados obtenidos y optimizar las alianzas establecidas)

1. Aunar esfuerzos con las instituciones participantes y AZCUBA para cumplimiento de objetivos.
2. Involucrar factores que intervienen en las decisiones ejecutivas de introducción de resultados y prestación de servicios en la agricultura nacional para unir fuerzas y contribuir al cumplimiento de los objetivos.

Preparado por

Ana Nelis San Juan Rodríguez

Nombre

Firma



Director del Proyecto

Cargo

Fecha: Septiembre 2020

Organización: Instituto Cubano de Investigaciones de los Derivados de la Caña de Azúcar (ICIDCA)

