

ARTÍCULO CIENTÍFICO

Efecto del medio de soporte en la estabilidad biológica de dos cepas de *Frankia* aisladas de *Alnus acuminata* H. B. K.

The effect of the means of solid support on the biological stability of two strains of Frankia isolated from Alnus acuminata HBK

Ana María Rey¹, D. Chamorro² y R. Barahona³

¹Universidad Cooperativa de Colombia, Sede Pasto-Colombia
Centro de Investigaciones. Calle 18 N° 47-150, Colombia

²Universidad Nacional Abierta y a Distancia Medellín-Colombia

³Departamento de Producción Animal, Facultad de Ciencias Agrarias
Universidad Nacional de Colombia, Sede Medellín
Correo electrónico: ana.reyob@ucc.edu.co

RESUMEN: *Alnus acuminata* H. B. K. es una especie arbórea que puede ser incorporada en sistemas silvopastoriles, ya que tiene la capacidad de crecer en suelos marginados y contribuir a la conservación de la biodiversidad y al mejoramiento del suelo; lo cual se relaciona con la incorporación de hojarasca, el efecto de sombra, la retención de humedad, el reciclaje de nutrientes y la fijación de nitrógeno atmosférico, debido a su asociación simbiótica con el actinomiceto *Frankia*. La utilización de este como inoculante es una tecnología que requiere un profundo análisis de su comportamiento en condiciones controladas. Por otra parte, para la comercialización de los biofertilizantes es importante conservar su calidad el mayor tiempo posible, de lo cual depende la aceptación del producto en la cadena productiva. Por ello, se realizó una investigación con el objetivo de evaluar la estabilidad biológica de las cepas nativas de *Frankia* (Aan17 y Aac49) con diferentes proporciones sustrato:cepa, así como el efecto del almacenamiento a 4 °C. Las cepas fueron tolerantes a los cambios del pH y al almacenamiento en condiciones de refrigeración. Se concluye que los inoculantes se deben almacenar a 4 °C durante 120 días, con una proporción de 80:20 (inoculante:sustrato) en Aan17 y 60:40 en Aac49. En estos sustratos la proteína microbiana se mantuvo por encima de 0,65 mg/mL en Aan17 y 0,7 mg/mL en Aac49.

Palabras clave: bioinoculantes, calidad, diazotrofos, fijación biológica de nitrógeno

ABSTRACT: *Alnus acuminata* H. B. K. is a tree species which can be incorporated in silvopastoral systems, because it has the capacity to grow on marginal soils and contribute to the conservation of biodiversity and to soil amelioration; which is related to the incorporation of litter, effect of shade, retention of humidity, nutrient recycling and fixation of atmospheric nitrogen, due to its symbiotic association with the actinomycete *Frankia*. The use of *Frankia* as inoculant is a technology that requires a deep analysis of its performance under controlled conditions. On the other hand, for the commercialization of biofertilizers it is important to preserve their quality as long as possible, on which the acceptance of the product in the productive chain depends. For such reason, a study was conducted in order to evaluate the biological stability of the native *Frankia* strains (Aan17 and Aac49) with different substratum:strain proportions, as well as the effect of storage at 4 °C. The strains were tolerant to the pH changes and the storage under refrigeration conditions. It is concluded that the inoculants should be stored at 4 °C during 120 days, with a proportion of 80:20 (inoculant:substratum) in Aan17 and 60:40 in Aac49. In these substrata the microbial protein remained over 0,65 mg/mL in Aan17 and 0,7 mg/mL in Aac49.

Key words: biological nitrogen fixation, bioinoculants, diazotrophs, quality

INTRODUCCIÓN

Los productores, los gremios y las instituciones promueven e implementan la utilización de buenas

prácticas en la producción ganadera para lograr un manejo sostenible y productivo de los sistemas y la

certificación ecológica, así como convertir la ganadería convencional en una práctica sostenible. En los últimos años las investigaciones han demostrado la importancia del uso estratégico de los árboles en los sistemas silvopastoriles (SSP), tecnología que ha sido adoptada de forma creciente por los productores. En el trópico alto, la implementación de los SSP es una alternativa para la recuperación de praderas degradadas que permite aumentar la productividad animal con un enfoque sostenible, lo cual resulta especialmente promisorio en los sistemas de leche especializados.

En Colombia, estos sistemas representan el 5 % del hatu nacional (1,2 millones de cabezas, aproximadamente) y producen 2 861 millones de litros de leche al año (alrededor de 52 % del total de leche producida). Además, generan de siete a ocho empleos por cada 100 animales y cubren un área de 4 906,344 ha (Lafaurie, 2008). En su plan estratégico de la ganadería colombiana (2019), FEDEGAN planteó que el desarrollo y la implementación de los modelos silvopastoriles constituyen una oportunidad para llevar a cabo los procesos de modernización de la ganadería colombiana.

En este sentido, un SSP que puede resultar beneficioso en el trópico de altura colombiano incluye a la especie nativa *Alnus acuminata* H. B. K. Esta es una arbórea multipropósito que, además de suministrar sombra a las praderas y los animales, mejora las condiciones de fertilidad del suelo, lo cual se asocia a la incorporación de hojarasca, la retención de humedad, el reciclaje de nutrientes y la alta capacidad de fijación de nitrógeno atmosférico (279-400 kg de N/ha/año). Este último beneficio se debe a que su sistema radical se asocia a microsimbiontes como el actinomiceto *Frankia*, que induce la formación de nódulos (Bautista y Valdés, 2008; Chamorro y Rey, 2008).

La inoculación de *A. acuminata* con cepas de *Frankia* como biofertilizante es una alternativa sostenible que ha mostrado respuestas positivas en variables dasométricas y de composición química. Estos efectos se relacionan no solo con la fijación de nitrógeno, sino también con la producción de ácido indolacético y la formación de asociaciones con otros microorganismos como las micorrizas, los solubilizadores de fosfato y los promotores de crecimiento vegetal (Gyaneshwar *et al.*, 2002; Rey, 2006; Nain *et al.*, 2010).

En Colombia, el Instituto Colombiano Agropecuario (ICA) es el responsable del control de los insumos agrícolas que se producen y comercializan

en el territorio nacional. Debido al incremento del uso de bioinsumos, el ICA emitió la resolución No. 00375 del 27 de febrero de 2004, la cual fue sustituida por la No. 698 del 4 de febrero de 2011, en la que se establecieron los requisitos para el registro de ensayos de eficacia, así como de productores e importadores de bioinsumos de uso agrícola. Con dicha resolución se pretende armonizar las normas colombianas con las internacionales para fortalecer las condiciones de producción, importación, comercialización y utilización de los bioinsumos, lo cual aumenta la calidad, eficacia y seguridad alimentaria en beneficio de la salud humana, la inocuidad del producto, la sanidad agropecuaria y el ambiente (ICA, 2013).

Debido a la falta de información sobre la producción de un inoculante de *Frankia*, es necesario realizar estudios que permitan identificar la estabilidad biológica del inóculo; garantizar que el sustrato sea compatible con el crecimiento, la supervivencia y la capacidad de nodulación del microsimbionte; así como lograr que las características de almacenamiento eviten la contaminación por otros microorganismos, en correspondencia con lo dispuesto en la resolución No. 698.

Teniendo en cuenta que el soporte es uno de los factores que garantizan la calidad del inoculante, así como que existen observaciones previas sobre los beneficios asociados al uso de la turba y la cascarilla de arroz como sustratos, el objetivo de esta investigación fue evaluar la estabilidad biológica de las cepas nativas de *Frankia* Aac49 y Aan17, con diferentes proporciones sustrato:cepa.

MATERIALES Y MÉTODOS

La cepa Aan17 fue aislada de una población natural de *A. acuminata* H. B. K., perteneciente a la vereda Cubijan Alto, del municipio Pasto (departamento de Nariño, Colombia), ubicado a 3 070 msnm y con una temperatura promedio de 13,5 °C; mientras que la cepa Aac49 se aisló en una población que pertenecía a la vereda Villa Nataly, localidad de Usme, departamento de Cundinamarca, a 3 045 msnm y 12 °C.

Estas cepas se clasificaron a nivel de género, mediante pruebas bioquímicas (crecimiento en fuentes de azúcares y nitrógeno), morfológicas (formación de estructuras especializadas: esporangios, vesículas e hifas) y moleculares (a través de la amplificación de una región variable V2-V3 del gen 16S rDNA). Después se evaluaron en plantas del hospedero, de forma independiente (Rey, 2006)

y en mezclas con un inóculo mixto de micorrizas (*Gigaspora* y *Glomus* sp.).

En la interacción con las micorrizas hubo una respuesta positiva; esta sinergia se evidenció en el rápido crecimiento y la mayor respuesta en las variables dasométricas y de composición química de *A. acuminata* durante la fase de vivero (Pintor, 2007; Chamorro y Rey, 2008). Basado en los resultados previos, estas cepas se consideraron como promisorias para la producción de inoculantes biológicos del suelo.

Las cepas se conservaron en medio benzil amina purina (BAP) más glicerol (500 μ L de BAP + 150 μ L de glicerol al 10 %) a 4 °C. Fueron activadas y crecieron durante dos meses en medio líquido BAP –modificado por Murry *et al.* (1984)–, lo que permitió obtener el cultivo *stock* con la biomasa requerida para realizar los microensayos. La temperatura de incubación fue de 36 °C, con una agitación constante de 150 rpm (Rey, 2006). Se realizaron tinciones en fresco con azul tripán, así como tinción de Gram con el fin de verificar la pureza de los aislamientos.

Preparación del inóculo de las cepas experimentales. Se preparó un preinóculo en 500 mL de medio líquido que contenía extracto de raíz, levadura y melaza (extracto de raíz de *A. acuminata*, 0,1 mL/L; 50 g de raíz disuelta en 1 L de agua; 100 mL de extracto de raíz/L de medio BAP; solución *stock* de micronutrientes (g/L): $MnCl_2 \cdot 4H_2O$ 1,81 $Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$ 0,025; solución *stock* de vitaminas (mg/100 mL): tiamina HCL 10, piridoxina HCL 5, ácido nicotínico 50, biotina 22,5, ácido fólico 10, riboflavina 10; solución *buffer* KH_2PO_4 1 M, K_2HPO_4 1 M). Este se mantuvo en agitación constante (150 rpm), a 36 °C, durante cinco días. Posteriormente el preinóculo fue introducido en 1 000 mL de medio de cultivo, por cinco días, en las mismas condiciones de incubación. Asimismo, los cultivos se homogenizaron con agitador magnético y plancha mecánica hasta lograr el rompimiento de las colonias. Cuando culminó el tiempo de incubación

se realizó un análisis de pureza por tinción de Gram (Murry *et al.*, 1984; Rey, 2006).

Medio de soporte. En los ensayos se utilizó como soporte una mezcla de turba y cascarilla de arroz, con una proporción de 1:3, la cual fue molida y tamizada en una malla de 0,16 mm. Dicho soporte se esterilizó en una autoclave, a 121 °C y 15 libras de presión (por 15 min), durante tres días consecutivos (Matos y Zúñiga, 2003). De acuerdo con las características del pH inicial del soporte (5,3), se realizó la corrección a un pH cercano a 6,5, mediante la adición de $CaCO_3$.

Condiciones de evaluación. La evaluación del inoculante se realizó en bolsas de polietileno de 70 g (100 g/bolsa), previamente esterilizadas en una autoclave, a 121 °C y 15 libras de presión, durante 30 min (Ramírez, 1992). A continuación, los sustratos fueron inoculados y para ello se utilizó una jeringuilla, según las proporciones de cada tratamiento. El periodo de maduración de los inoculantes fue de 8 días a 24 °C, para permitir la formación de estructuras de resistencia –esporas y vesículas– (Materon y Weaver, 1985). Después, las mezclas se almacenaron a 4 °C, durante 0, 30, 60, 90 y 120 días.

Diseño y tratamientos. Para determinar el efecto del soporte en la viabilidad y las estructuras especializadas de las cepas nativas de *Frankia*, se evaluaron proporciones turba:casarilla y medio de cultivo:cepa; esta proporción se basó en las utilizadas para inoculantes de rizobios por Ramírez (1992). Los tratamientos se muestran en la tabla 1.

El diseño fue completamente al azar, con tres réplicas. Se utilizaron dos cepas, cada una con tres proporciones de soporte por tratamiento y cinco periodos de almacenamiento, para un total de 30 tratamientos y 90 evaluaciones.

Prueba de estabilidad biológica de los inoculantes. La estabilidad biológica se evaluó durante el almacenamiento mediante la cuantificación de la proteína microbial, según la metodología

Tabla 1. Proporciones empleadas en el ensayo.

Cepa	Sustrato:suspensión
Aan17	T1: 60 g de sustrato + 40 mL de suspensión de la cepa
	T2: 70 g de sustrato + 30 mL de suspensión de la cepa
	T3: 80 g de sustrato + 20 mL de suspensión de la cepa
Aac49	T4: 60 g de sustrato + 40 mL de suspensión de la cepa
	T5: 70 g de sustrato + 30 mL de suspensión de la cepa
	T6: 80 g de sustrato + 20 mL de suspensión de la cepa

propuesta por Lowry *et al.* (1951) y modificada por Rey (2006).

Medición del pH del inoculante. Para medir el pH se diluyó la turba en agua destilada estéril (1:2), se sometió a agitación durante 20 minutos a 100 rpm y se dejó reposar (Estrada *et al.*, 2009).

Cálculo del porcentaje de humedad de los inoculantes. Se realizó el secado en horno a temperatura constante de 60 °C, hasta obtener un peso constante. El cálculo se hizo mediante la diferencia entre la masa de muestra húmeda y la muestra seca multiplicada por cien (Estrada *et al.*, 2009).

Procesamiento estadístico. Los datos se sometieron a un análisis de varianza (ANOVA) y las medias se compararon mediante la dócima de Tukey para un 5 % de significación, después de verificar que cumplían con el ajuste de distribución normal y de homogeneidad de varianza. Todos los análisis se realizaron a través del programa estadístico Statistic Analysis System (SAS, 1997).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Efecto del medio de soporte en la sobrevivencia de las cepas de Frankia en los inoculantes

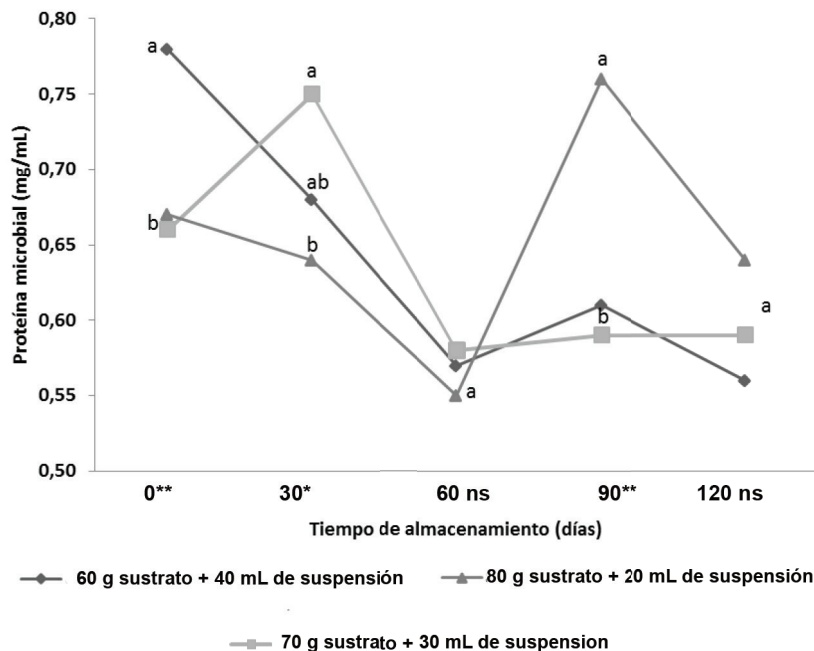
En las figuras 1 y 2 se muestra el efecto del medio de soporte en la estabilidad biológica de las

cepas nativas de *Frankia*, durante los periodos de conservación.

La cepa Aan17 comenzó con una concentración de proteína microbial de 0,70 mg/mL, con diferencias significativas a los 30 y 90 días (fig. 1). En general, dicha concentración tendió a disminuir debido a la conservación. Esta se mantuvo en la proporción 80:20, con un valor mínimo de descenso de 0,55 mg/mL a los 60 días, el cual se incrementó a los 90 días (0,76 mg/mL).

En la cepa Aac49 hubo descensos en el crecimiento a partir de los 30 días, sin diferencias significativas en los días de almacenamiento. El valor mínimo de proteína microbial se obtuvo a los 60 días, mientras que a los 90 días se observó un aumento de esta en todas las proporciones. Si se tienen en cuenta las características de este microsimbionte, se puede suponer que el efecto se debe a la producción de estructuras especializadas, como las esporas, lo cual se corroboró a los 120 días de almacenamiento.

En el último periodo de almacenamiento se observó la presencia de esporas y esporangios como un mecanismo de reproducción y defensa a las condiciones de conservación. Los tratamientos con proporciones 70:30 y 80:20 mostraron una mayor tendencia a generar esporangios con formas diferentes. Al parecer, la menor humedad incidió en la



** Diferencias altamente significativas ($p < 0,01$), * diferencias significativas ($p < 0,05$), n. s.: no existen diferencias.
Promedios con letras iguales no difieren significativamente (Tukey)

Figura 1. Efecto del sustrato en la sobrevivencia de la cepa Aan17.

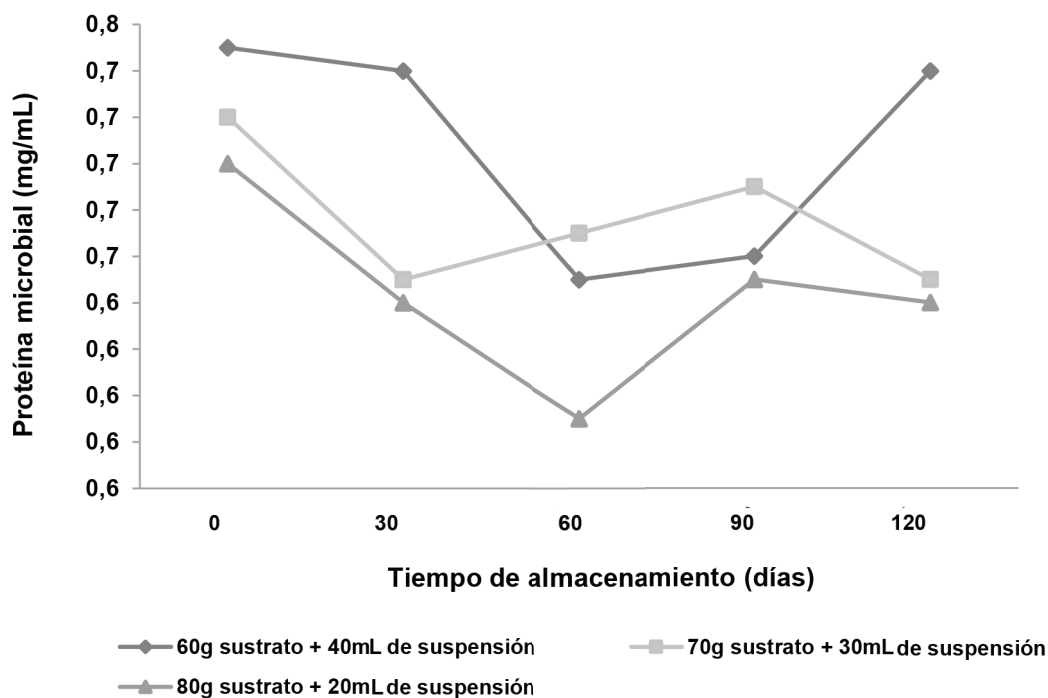


Figura 2. Efecto del sustrato en la sobrevivencia de la cepa Aac49.

formación de este tipo de estructuras, lo cual posiblemente esté asociado a las condiciones de estrés que se presentaron en los medios.

A partir de los 120 días de almacenamiento no hubo diferencia significativa en las concentraciones celulares de las cepas Aac49 y Aan17, por lo que se puede concluir que los inoculantes a base de estos microorganismos se comportaron de manera estable en las condiciones de almacenamiento y con las proporciones utilizadas.

Los resultados de esta investigación evidenciaron que las cepas de *Frankia* son tolerantes al almacenamiento en turba y refrigerado; ello se puede asociar a que estas proceden de bosques de alisos (*A. acuminata*) localizados en los Andes del trópico alto colombiano de Nariño y Cundinamarca, donde es común la presencia de turba y existen suelos originados por cenizas volcánicas. Además, en los sitios de recolección había una alta producción de hojarasca debido al efecto de los alisos. Asimismo, la formación de estructuras especializadas (como los esporangios) es muy importante, ya que estas actúan como un mecanismo de protección contra condiciones adversas. En los microorganismos, el efecto de las bajas temperaturas en las células

produce la inactivación del crecimiento debido a la pérdida de fluidez de la membrana plasmática, lo que genera descenso en las funciones metabólicas, en el transporte de los nutrientes y en los gradientes de concentración (Sylvia *et al.*, 2005). Por ello dicho efecto se puede tener en cuenta para el almacenamiento y la conservación de este tipo de inoculantes.

A nivel internacional, los estándares de calidad de los inoculantes se han definido para bacterias fijadoras de nitrógeno, como *Rhizobium*, *Azotobacter* y *Azospirillum*, con recuentos mínimos de viables que van desde 5×10^7 hasta 1×10^9 UFC/g o mL de inoculante (Benintende, 2010). Sin embargo, no existen indicadores, tanto en Colombia como a nivel internacional, respecto a la concentración mínima efectiva de inoculantes preparados a partir de cepas de *Frankia*.

En cepas de otros microorganismos fijadores de nitrógeno (*Rhizobium*, *Azospirillum* y *Azotobacter*) se han realizado estudios con el empleo de la turba como sustrato. González y Rondón (1998), al utilizar tres tipos de turba como portadores durante la producción de un inoculante basado en *Azospirillum*, observaron que la turba parda mantuvo la

mayor viabilidad de la cepa hasta el final del periodo de evaluación (180 días).

Por su parte, Estrada (2002) evaluó el efecto de la calidad de los inoculantes almacenados a diferentes temperaturas, con la inclusión de la turba como sustrato. Este autor señaló que la temperatura de almacenamiento del inoculante incide sobre la conservación de la población de bacterias diazotróficas, y que los mejores resultados se obtienen a 19-26 °C. A 4°C, dos de las cepas estudiadas alcanzaron una conservación adecuada, por encima de 10⁸ UFC/g de inoculante, durante los 150 días de evaluación.

En la presente investigación se evidenció que la eficiencia de la inoculación con *Frankia* está determinada, principalmente, por los estados tempranos de desarrollo de la planta durante las primeras semanas después de la colonización óptima de las raíces. En especies de *A. acuminata* se han realizado diversos estudios sobre el efecto de la inoculación a partir de nódulos macerados (Nickel *et al.*, 2001; Ridgway *et al.*, 2004) y de cepas que crecieron en medios de cultivo enriquecidos, métodos que solo pueden ser viables para fines investigativos. Sin embargo, en este tipo de experimentos *Frankia* es uno de los microorganismos menos estudiados para la producción de inoculante.

Efecto del almacenamiento en la humedad de los inoculantes

Las condiciones de almacenamiento y la temperatura (4 °C) generaron una pérdida de humedad del inoculante de 0,5 a 6 % (tabla 2).

El aislamiento Aan17 presentó pérdidas de humedad significativas, lo que se evidenció, principalmente, en las proporciones 60:40 y 80:20; mientras que la proporción 70:30 mantuvo condiciones más

estables. Por otra parte, en Aac49 hubo una mayor pérdida de humedad en los tres inóculos al finalizar la evaluación.

Estrada *et al.* (2009) estudiaron el efecto de la temperatura de almacenamiento en la calidad de los inoculantes, con la utilización de turba como soporte sólido, en poblaciones de *Azospirillum brasilense* Sp245 (BR11005), *Azospirillum amazonense* Y2 (ATCC35120), *Herbaspirillum seropedicae* ZAE94 (BR11417) y *Rhizobium tropici* BR322 (CIAT 1988). Adicionalmente, ellos incluyeron las variables pH y humedad del inoculante hasta los 150 días de almacenamiento. Los resultados indicaron que para este tipo de fijadores de nitrógeno la temperatura ambiente entre 19 y 26 °C fue la más adecuada para realizar la conservación de los inoculantes, durante 150 días de almacenamiento.

Efecto de la conservación de los inoculantes en la dinámica del pH

La dinámica del pH fue afectada durante el tiempo de almacenamiento. Se observaron diferencias significativas en todos los tratamientos, excepto en la proporción 80:20 de Aac49 (tabla 3).

El descenso del pH en los inoculantes pudo deberse a que el medio de cultivo en el que se multiplicó el inoculante contenía melaza, extracto de raíz y levadura, los cuales fueron metabolizados por las cepas para formar estructuras especializadas (esporas y esporangios) como consecuencia de la temperatura de conservación y la humedad del medio de soporte (Swan y Karalazos, 1990).

CONCLUSIONES

- Se halló diversidad en las cepas.
- El soporte con turba:cascarilla a 4 °C fue el adecuado para conservar los inoculantes durante

Tabla 2. Porcentaje de humedad de los inoculantes preparados con dos aislamientos de *Frankia*.

Aislamiento	Tratamiento	Tiempo (días)				
		0	30	60	90	120
Aan17	60 g de sustrato + 40 mL de suspensión *	78,0 ^a	74,5 ^b	72,5 ^b	75,0 ^{ab}	72,5 ^b
	70 g de sustrato + 30 mL de suspensión *	62,0 ^a	58,5 ^b	62,5 ^a	65,0 ^a	62,5 ^a
	80 g de sustrato + 20 mL de suspensión **	63,0 ^a	59,5 ^b	57,5 ^b	60,0 ^{ab}	57,5 ^b
Aac49	60 g de sustrato + 40 mL de suspensión **	69,0 ^a	66,0 ^{ab}	64,0 ^b	66,5 ^{ab}	64,0 ^b
	70 g de sustrato + 30 mL de suspensión *	66,5 ^a	62,5 ^b	60,5 ^b	63,0 ^{ab}	60,5 ^b
	80 g de sustrato + 20 mL de suspensión*	61,5 ^a	58,5 ^{ab}	56,5 ^b	59,0 ^{ab}	56,5 ^b

**Diferencias altamente significativas ($p < 0,01$), *diferencias significativas ($p < 0,05$). Promedios en una misma fila con letras iguales no difieren significativamente.

Tabla 3. Efecto del almacenamiento en el pH de los inoculantes.

Aislamiento	Tratamiento	Tiempo (días)				
		0	30	60	90	120
Aan17	60 g de sustrato + 40 mL de suspensión*	6,60 ^a	6,07 ^{bc}	6,10 ^b	5,87 ^{bc}	5,75 ^c
	70 g de sustrato + 30 mL de suspensión**	6,65 ^a	5,94 ^b	5,92 ^b	5,93 ^b	5,94 ^b
	80 g de sustrato + 20 mL de suspensión**	6,49 ^a	6,07 ^b	6,17 ^b	6,26 ^{ab}	6,21 ^b
Aac49	60 g de sustrato + 40 mL de suspensión**	6,60 ^a	6,49 ^{ab}	6,27 ^{bc}	6,14 ^c	6,13 ^c
	70 g de sustrato + 30 mL de suspensión**	6,71 ^a	6,38 ^a	5,44 ^b	6,06 ^{ab}	6,07 ^{ab}
	80 g de sustrato + 20 mL de suspensión ^{ns}	6,40	6,20	6,32	6,20	6,13

**Diferencias altamente significativas ($p < 0,01$), *diferencias significativas ($p < 0,05$), n. s.: no existen diferencias. Promedios en una misma fila con letras iguales no difieren significativamente.

120 días de almacenamiento; la proporción más conveniente para Aan17 fue 80:20 y para Aac49, 60:40.

- Al almacenar los inoculantes a 4 °C se perdió menos humedad en los tratamientos; la cepa Aan17 tuvo la mayor pérdida (5 %) en las proporciones 60:40 y 80:20, mientras que Aac49 presentó pérdidas de entre 3,5 y 5 % en las tres proporciones.
- El pH se afectó durante el tiempo de almacenamiento, con un mínimo de 5,75; pero estos descensos no influyeron de forma significativa en la estabilidad biológica de las cepas.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Bautista G. H. & Valdés, M. *Frankia* y la simbiosis actinorrízica. *Revista Latinoamericana de Microbiología*. 50 (3-4):90-102, 2008.
- Benintende, S. Calidad de inoculantes comerciales para el cultivo de soja en la Argentina: concentración de rizobios viables y presencia de contaminantes. *Revista Argentina de Microbiología*. 42:129-132, 2010.
- Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT). *Simbiosis leguminosa-Rhizobium. Manual de métodos de evaluación, selección y manejo*. Programa de Pastos Tropicales y Programa de Frijol. Cali: CIAT, 1988.
- Chamorro, D. & Rey, A. M. El componente arbóreo como dinamizador del sistema de producción de leche en el trópico alto colombiano. Experiencias de Corpoica-Tibaitatá. En: E. Murgueitio, C. A. Cuartas y J. F. Naranjo, eds. *Ganadería del futuro: investigación para el desarrollo*. Cali: Fundación CIPAV. p. 349-398, 2008.
- Estrada, G. A.; Bonilla, R. R. & Divan, V. L. Efecto de diferentes temperaturas de almacenamiento sobre la calidad de bioinoculantes turbosos. *Corpoica Ciencia Tecnología Agropecuaria*. 10 (2): 205-213, 2009.
- Estrada, B. G. *Calidad de inoculantes almacenados a diferentes temperaturas: Efecto sobre la población, humedad y pH del producto*. Trabajo de grado para obtener el título de Microbiólogo Industrial. Colombia: Pontificia Universidad Javeriana, 2002.
- Gyaneshwar, P.; Kumar, G. N.; Parekh, L. J. & Poole, P. S. Role of soil microorganisms in improving P nutrition of plants. *Plant and Soil*. 245: 83-93, 2002.
- Instituto Colombiano Agropecuario (ICA). Resolución No. 698 del 4 de febrero de 2011, 2013. <http://www.ica.gov.co/getattachment/225bd110-d1c4-47d7-9cf3-43745201e39a/2011R698.aspx>. [7/7/2013].
- Isora, G. & Rondón, A. J. Estudio de la turba como portador para la producción de inoculante a base de *Azospirillum*. *Pastos y Forrajes*. 21 (2): 1-3, 1998.
- Lafaurie, J. F. Ganadería del futuro: Responsabilidad social y ambiental. En: E. Murgueitio, C. A. Cuartas y J. F. Naranjo, eds. *Ganadería del futuro: investigación para el desarrollo*. Cali: Fundación CIPAV. p. 13-17, 2008.
- Lowry, O. H.; Rosebrough, N. J.; Farr, A. L. & Randall, R. J. Protein measurement with the folin phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry*. 265-275, 1951.
- Materon, L. A. & Weaver, R. W. Inoculant maturity influences survival of rhizobia on seed. *Applied Environmental Microbiology*. 49:465-467, 1985.
- Matos, G. C. & Zúñiga, D. D. Variabilidad de cepas de rizobios en inoculantes basados en soportes no estériles. *Ecología Aplicada*. 2 (1): 81-85, 2003.
- Murry, M. A.; Fontain M. S. & Torrey, J. G. Growth kinetics and nitrogenase induction in *Frankia* sp. HFPAr.3 grown in batch culture. *Plant and Soil*. 78:61-78, 1984.
- Nain, L.; Rana, A.; Joshi, M.; Jadhav, S. D.; Kumar, D.; Shivay, Y. S. *et al.* Evaluation of synergistic effects of bacterial and cyanobacterial strains as biofertilizers for wheat. *Plant and Soil*. 331: 217-230, 2010.

- Nickel, A.; Pelz, O.; Hahn, D.; Saurer, M.; Siegwolf, R. & Zeyer, J. *et al.* Effect of inoculation and leaf litter amendment on establishment of nodule-forming *Frankia* populations in soil. *Applied and Environmental Microbiology*. 64 (6): 2603-2609, 2001.
- Pintor, F. H. *Efecto de la doble inoculación de Frankia y micorrizas arbusculares en aliso (Alnus acuminata) H.B.K. en fase de vivero.* Trabajo de grado para optar el título de Ingeniero Agrónomo. Bogotá: UDCA, 2007.
- Ramírez, M. *Técnicas de microbiología de suelos aplicadas a la fijación biológica de nitrógeno.* p. 159-176, 1992.
- Rey, A. M. *Estudio de la actividad de cepas nativas de Frankia en Alnus acuminata H.B.K.* Tesis de maestría en Microbiología. Bogotá: Universidad Nacional de Colombia, Facultad de Ciencias, 2006.
- Ridgway, K. P.; Marland, L. A.; Harrison, A. F.; Wright, J.; Young, J. P. W. & Fitter, A. H. Molecular diversity of *Frankia* in root nodules of *Alnus incana* grown with inoculum from polluted urban soils. *Microbiology Ecology*. 50:255-263, 2004.
- Swan, H. & Karalazos, A. Las melazas y sus derivados. *Geoplacea*. 19:78-82, 1990.
- Sylvia, D. M.; Fuhrmann, J. J.; Hartel, P. G. & Zuberer, D. V. *et al.* *Principles and applications of soil microbiology*. 2nd ed. New Jersey: Pearson Princeton Hall, 2005.

Recibido el 25 de octubre de 2013

Aceptado el 17 de septiembre de 2014

6^{to} TALLER SOBRE MANEJO INTEGRADO COSTERO, MARTÍ 2015

I Encuentro Técnico Forestal

«Protección costera para la seguridad humana y económica /Papel de bosques y árboles»

Estación Experimental Agroforestal Itabo

17 de febrero, 2015

Estimados colegas:

El Comité Organizador del 6^{to} taller sobre manejo integrado costero, I Encuentro Técnico Forestal, se honra en invitarle a participar en este importante evento que tendrá lugar el día 17 de febrero de 2015, en el marco de las actividades por el 20 de febrero, Día del Manejo Integrado Costero para el Municipio de Martí. Esperamos darle la bienvenida en nuestro municipio, seguros de que con su participación lograremos contribuir a la mejor planificación de la zona costera, a la ordenación de los bosques costeros y a la mitigación de catástrofes; así como a profundizar en el conocimiento del papel de los bosques y los árboles en la protección de poblaciones y bienes contra los peligros naturales más comunes y destructivos en la zona costera (los ciclones, la erosión, los vientos y la salinización), objetivos fundamentales de este taller.

TEMÁTICAS:

- Manejo sostenible y protección forestal en ecosistemas costeros.
- Conservación de la biodiversidad de los ecosistemas costeros forestales.
- Aprovechamiento forestal de bajo impacto ambiental en ecosistemas costeros.
- Bienes y servicios ambientales de los ecosistemas costeros forestales.

ORGANIZADORES:

Estación Experimental Agroforestal Itabo
Oficina de Manejo Integrado Costero. Varadero (CSAM)

AUSPICIADORES:

Estación Experimental Agroforestal Itabo
Asociación Nacional de Economistas de Cuba (ANEC)
Asociación Cubana de Técnicos Agrícolas y Forestales (ACTAF)
Delegación Municipal de la Agricultura
Gobierno Municipal. Martí
Grupo Costatenas, Universidad de Matanzas
Estación Experimental de Pastos y Forrajes Indio Hatuey

Para más información dirijase a: emctmarti@atenas.inf.cu
