

**ESTUDIO DE LAS INTERACCIONES PLANTA-BACTERIA-BIOCARBÓN Y DE
SU EFECTO PROMOTOR DE LA PRODUCTIVIDAD DE ESPECIES DE
CULTIVOS**

Lina Marcela Montoya Pizarro

**UNIVERSIDAD ICESI
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES
BIOLOGÍA
2016**

**ESTUDIO DE LAS INTERACCIONES PLANTA-BACTERIA-BIOCARBÓN Y DE
SU EFECTO PROMOTOR DE LA PRODUCTIVIDAD DE ESPECIES DE
CULTIVOS**

Lina Marcela Montoya Pizarro

TUTORA:

Dra. Thaura Ghneim Herrera

**UNIVERSIDAD ICESI
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES
BIOLOGÍA
2016**

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a Dios por ser mi fortaleza y por permitirme alcanzar este logro acompañada de la colaboración de muchas personas.

A Mayagüez S.A. por su continuo e incondicional apoyo que ha sido una bendición para mí y mi familia, y que me ha permitido continuar con mis estudios.

A mi familia por su gran apoyo; a mi madre por ser una guía para mí, a mi hermana María por sus consejos, ánimo y ayuda, a mi padre y a todo el resto de mi familia que de muchas maneras han aportado en mi vida.

A mi tutora Dra. Thaura Ghneim por su ejemplo, ayuda, respaldo y paciencia.

A la Ing. Biol. Sandra Moreno por su valioso apoyo para el desarrollo de los experimentos realizados en este estudio.

A mis maestros por compartir su conocimiento e inspirarme, a mis amigos y compañeros por acompañarme en este proceso.

Dios los bendiga a todos.

CONTENIDO

RESUMEN -----	10
1. INTRODUCCIÓN -----	11
2. DESCRIPCIÓN DEL PROYECTO: -----	12
2.1 Planteamiento de la pregunta -----	12
2.2 Marco teórico y estado del arte -----	13
2.2.1 Impacto ambientales de la agricultura-----	13
2.2.2 Biocarbón -----	14
2.2.3 Beneficios del Biocarbón -----	15
2.2.4 Limitantes del biocarbón-----	17
2.2.5 Microorganismos del suelo-----	18
2.2.6 Metodología para evaluar la abundancia y diversidad de bacterias en el suelo	18
2.2.7 DGGE-----	19
2.2.8 DAPI -----	21
2.3 Objetivos -----	22
2.3.1 Objetivo General -----	22
2.3.2 Objetivos Específicos-----	22
2.4 Metodología -----	23
2.4.1 Obtención Biocarbón -----	23
2.4.2 Material vegetal-----	23
2.4.3 Diseño experimental y tratamientos -----	23
2.4.4 Origen de suelo, esterilización del suelo y validación de esterilidad -----	24
2.4.5 Muestreo del suelo para análisis de abundancia y diversidad de bacterias -----	25
2.4.6 Análisis de abundancia de bacterias-----	25
2.4.7 Extracción de ADN bacteriano -----	26
2.4.8 Análisis de diversidad bacteriana -----	27
2.4.9 Análisis fisicoquímico del suelo-----	28
2.4.10 Medidas de crecimiento y productividad-----	28
2.4.11 Análisis estadístico -----	28
2.5 Resultados -----	30
2.5.1 Confirmación de presencia de bacterias en el suelo y validación del proceso de esterilidad-----	30
2.5.2 Efecto de la aplicación de biocarbón derivado de cascarilla de arroz sobre el crecimiento de <i>Capsicum annuum</i> (aji).-----	31
2.5.3 Efecto de la aplicación de biocarbón derivado de cascarilla de arroz sobre el crecimiento de <i>Oryza sativa</i> cv. Azucena-----	32
2.5.4 Características fisicoquímicas del suelo y biocarbón -----	41
2.5.5 Abundancia de bacterias mediante técnica de fluorescencia (DAPI) -----	42
2.5.6 Extracción del ADN bacteriano -----	43

2.5.7 Amplificación del gen 16S rARN mediante PCR-----	43
2.5.8 Análisis de diversidad bacteriana mediante la técnica del DGGE-----	44
2.6 Discusión -----	46
2.7 Potenciales beneficiarios-----	50
2.8 Impacto ambiental -----	51
2.9 Conclusiones-----	52
2.10 Recomendaciones-----	53
2.11 Bibliografía -----	54
2.12 Anexos -----	58

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Detalles del diseño experimental y de los tratamientos establecidos para realizar el experimento.....	23
Tabla 2. Composición de las soluciones tampón empleadas para el lavado de las muestras de suelo, priori a la extracción de ADN.....	277
Tabla 3. Condiciones de PCR para la amplificación del gen 16S rARN a partir de ADN extraído de muestras de suelo.....	277
Tabla 4. Matriz lógica.....	299
Tabla 5. Cronograma de actividades.....	30
Tabla 6. Número de días para alcanzar el 50% de floración en los distintos tratamientos.....	333
Tabla 7. Características fisicoquímicas del suelo de los distintos tratamientos determinadas al inicio (día 0) y final del experimento (120 DDT).	411
Tabla 8. Bacterias totales cuantificadas mediante tinción fluorescente con DAPI.	422
Tabla 9. Características fisicoquímicas del biocarbón derivado de cascarilla de arroz.....	58

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Diagrama del proceso de esterilización del suelo.....	24
Figura 2. Diagrama del proceso de validación de esterilidad del suelo.....	25
Figura 3. Diagrama del proceso de tinción y visualización de bacterias usando DAPI.....	26
Figura 4. Diagrama del análisis de diversidad bacteriana usando la técnica del DGGE.....	28
Figura 5. Bacterias cultivables presentes en el suelo control (no estéril), observadas luego de diluciones seriadas de la fracción bacteriana aislada del suelo. (A) Dilución 10^{-1} , (B) 10^{-2} , (C) 10^{-3} , (D) 10^{-4} y (E) 10^{-5}	31
Figura 6. Validación de esterilidad para el suelo empleando en tratamientos SE y SE + B. (A) Suelo estéril usado para el experimento del ají, (B) Suelo estéril usado para el experimento de arroz.....	31
Figura 7. Desarrollo de las plantas de ají, luego de estar sometidas a los distintos tratamientos durante 108 días.....	32
Figura 8. Diferencias de desarrollo exhibidas por las plantas de arroz bajo los cuatro tratamientos experimentales.....	34
Figura 9. Uniformidad de respuesta de crecimiento de las plantas de sometidas a los distintos tratamientos. Se muestran la totalidad de plantas bajo cada tratamiento luego de 56 DDT.....	35
Figura 10. Diferencias observadas en el desarrollo del sistema radicular en respuesta a los distintos tratamientos al final del experimento (125 DDT).....	36
Figura 11. Respuesta de crecimiento las plantas de arroz a los distintos tratamientos. (A) Altura, (B) Biomasa foliar, (C) Biomasa de tallos, (D) Número de hojas y (E) Número de tallos. Las mediciones se realizaron al final del experimento (125 DDT).....	37

Figura 12. Respuesta de crecimiento las plantas de arroz a los distintos tratamientos. (A) Número de panículas, (B) Peso de panículas y (C) Longitud de panícula. Las mediciones se realizaron al final del experimento (125 DDT).....	39
Figura 13. Respuesta de rendimiento de las plantas de arroz a los distintos tratamientos. (A) Número de granos y (B) Peso total de granos. Las mediciones se realizaron al final del experimento (125 DDT).....	40
Figura 14. Respuesta del rendimiento de las plantas de arroz a los distintos tratamientos. (A) Peso de 100 granos y (B) Porcentaje de granos llenos. Las mediciones se realizaron al final del experimento (125 DDT).....	40
Figura 15. Anillo bacteriano obtenido por centrifugación diferencial con gradiente de Nycodenz.....	42
Figura 16. Fotografías de bacterias teñidas con DAPI.....	42
Figura 17. ADN total extraído de distintas muestras de suelo antes de la amplificación V3 del gen 16S rARN . Carril 1-3; SC, 60 DDT. Carril 4-6; SC+B, 60 DDT. Carril 7-9; SC, 90 DDT. Carril 10-12; SC+B, 90 DDT.....	43
Figura 18. Amplificación del gen 16S con los iniciadores 518F y 800R. Carril 1-6 corresponden a tres réplicas del tratamiento SC y SC+B, 60 DDT, respectivamente. Los carriles 7-12 corresponden a tres réplicas del tratamiento SC y SC+B, 90 DDT, respectivamente. (+) E. coli y P. agglomerans, respectivamente; (-) Control negativo de la reacción; (MM) Marcador molecular.....	43
Figura 19. PCR anidada con los iniciadores 518F-GC y 800R. Los carriles 1, 2 y 3 corresponden a tres réplicas del tratamiento SC en el día 60. Los carriles 4, 5, 6, 7, 8 y 9 corresponden a tres réplicas del tratamiento SC y SC+B en el día 90, respectivamente. (+) E. coli y P. agglomerans, respectivamente; (-) Controles negativos de la reacción; (MM) Marcador molecular.....	44
Figura 20. DGGE para algunas muestras. Carril 2-4; SC+B, 0 DDT. Carril 5, 9 y 10; SC, 0 DDT. Carril 11) E.coli, 12) P. agglomerans y 1) mezcla de controles. Carril 6-8; muestras que no conciernen al experimento.....	45

RESUMEN

El desarrollo agrícola ha causado un gran impacto ambiental como la degradación de los suelos. Por ello se buscan estrategias que reduzcan el efecto adverso de las prácticas agrícolas sobre el medio ambiente, como por ejemplo el uso de biofertilizantes y la implementación de prácticas de manejo sostenibles que permitan mantener o aumentar la productividad de los cultivos. El biocarbón (biochar, en inglés) tiene un gran potencial como mitigador ambiental, capaz de rehabilitar suelos degradados y disminuir la dependencia de fertilizantes químicos en los cultivos.

En este proyecto evaluamos el efecto de la aplicación de un biocarbón derivado de cascarilla de arroz sobre el crecimiento y productividad de las especies de cultivo *Oryza sativa* (arroz) y *Capsicum annuum* (ají) y su relación con cambios en las características químicas del suelo, la abundancia y diversidad de las comunidades bacterianas del suelo.

Los experimentos siguieron un diseño factorial con dos factores y dos niveles: 1) Biocarbón (+biocarbón, -biocarbón); 2) Esterilización del suelo (+esterilización; -esterilización). El crecimiento de las plantas se monitoreó semanalmente desde la transferencia a los tratamientos hasta el final del experimento (120 días) cuando se cuantificó el rendimiento y la producción de biomasa. La abundancia de las comunidades bacterianas se evaluó a través de tiempo (0, 30, 60, y 90 días de tratamiento), mientras que las propiedades físico-químicas del suelo se caracterizaron al inicio y al final del experimento (0 y 120 días).

La adición de biocarbón al suelo afectó positivamente el crecimiento de las plantas de arroz y ají. Las plantas de arroz cultivadas en suelos con biocarbón mostraron un mayor vigor en las etapas iniciales de crecimiento, con diferencias significativas en altura y número de tallos. El efecto del biocarbón fue más marcado en las plantas cultivadas en los suelos sometidos a esterilización. Aunque las diferencias entre los tratamientos tendieron a reducirse a través del tiempo, al momento de la cosecha se observaron diferencias significativas en la producción de biomasa y el rendimiento, con mayor crecimiento y productividad en las plantas cultivadas en presencia de biocarbón. El efecto promotor del crecimiento ejercido por el biocarbón estuvo asociado con un incremento del pH -indicador correlacionado positivamente con la fertilidad del suelo- y con mayores niveles de fósforo y magnesio. El efecto de la aplicación de biocarbón sobre la abundancia de microorganismos del suelo varió en respuesta a la condición inicial del suelo. En los suelos sometidos a esterilización, se observó un efecto positivo del biocarbón sobre la abundancia de microorganismos edáficos, mientras que en los suelos no esterilizados no se estableció un efecto claro. Los resultados obtenidos indican que el biocarbón derivado de la cascarilla de arroz representa una enmienda orgánica alternativa para la recuperación de suelos degradados, particularmente para suelos afectados por prácticas agrícolas.

Palabras claves: Biocarbón, rendimiento, bacterias, propiedades fisicoquímicas, arroz.

1.INTRODUCCIÓN

La agricultura intensiva impulsada por la demanda creciente de alimentos ha causado un gran deterioro en los suelos (Barrow, 2012), lo cual ha propuesto un escenario en el que se valoran estrategias que permitan un desarrollo agrícola y proteja el medio ambiente (Carvajal & Mera, 2010). El biocarbón resulta ser una de las estrategias que se propone como una enmienda orgánica de los suelos, ya que favorece la estrecha simbiosis existente entre bacterias y plantas que acelera la recuperación de los suelos.

El biocarbón es un subproducto sólido de la pirólisis de materia orgánica, puede obtenerse a partir de distintos materiales biológicos (Augustenborg, y otros, 2012). Se ha utilizado como una enmienda del suelo para mejorar la fertilidad, a partir del hallazgo de las tierras oscuras del Amazonas (*Terra Preta*), muy fértiles como resultado de la acumulación de biocarbón producto de la actividad antrópica (Barrow, 2012). Existen numerosos reportes que afirman que la aplicación de biocarbón en los suelos aumenta la productividad y rendimiento de las plantas (Lehmann, y otros, 2011), se relaciona positivamente con la abundancia y diversidad bacteriana y afecta las propiedades fisicoquímicas del suelo como el contenido de elementos y el pH (Fisher & Glaser, 2012).

El biocarbón podría ser una alternativa y un insumo clave para elevar y sostener la producción agrícola, mejorar la retención de humedad del suelo, y reducir la dependencia de los fertilizantes industriales (Barrow, 2012). Sin embargo, son necesarios más estudios alrededor de este tema para poder implementar el uso del biocarbón como una estrategia de mitigación ambiental en la agricultura moderna debido a que tiene un gran periodo de residencia en el suelo y tiene efectos sobre microbiota del suelo. Además, la materia prima y las características del proceso de pirolisis determinan las propiedades del biocarbón (Spokas, y otros, 2012), por ello es necesario analizar los impactos en la respuesta de las plantas al usar los distintos tipos de biocarbón, por ejemplo, el biocarbón derivado de cascarilla de arroz usado en este estudio.

En este trabajo se analizó el efecto de la aplicación de biocarbón derivado de cascarilla de arroz sobre la productividad de *Oryza sativa* (arroz), y *Capsicum annuum* (ají). Adicionalmente se evaluó el cambio en la abundancia de bacterias del suelo al aplicar biocarbón. La abundancia se determinó mediante la tinción fluorescente con el fluorocromo 4',6-diamino-2-fenilindol (DAPI). También se evaluó la diversidad bacteriana usando la técnica de electroforesis en gel de gradiente desnaturante (DGGE), empleando fragmentos amplificados de la región V3 de gen 16S rARN. De manera complementaria se obtuvieron resultados del análisis fisicoquímico del suelo al inicio y al final del experimento.

2. DESCRIPCIÓN DEL PROYECTO:

2.1 Planteamiento de la pregunta

¿Cuál es el efecto del biocarbón derivado de cascarilla de arroz sobre la productividad de especies de cultivo como el arroz y el ají?

El creciente uso de fertilizantes químicos alentado por la gran demanda de alimentos, ha impactado negativamente la composición y estructura de los suelos debido a que afecta el pH y CIC, generando como resultado reducción del rendimiento de los cultivos (Liu, 2009), además son potenciales contaminantes de las masas de agua. De esta manera se busca alternativas que se beneficien de la estrecha interacción que existe entre las plantas y las bacterias para acelerar el proceso de recuperación de los suelos degradados. Es allí donde el biocarbón resulta ser una alternativa muy prometedora, pues hay numerosos estudios que muestran que hay un aumento en la biomasa microbiana al aplicar biocarbón al suelo. Además, existen reportes que indican que el uso de biocarbón adicionalmente a la acelerar el establecimiento de microorganismos también mejora la estructura del suelo, su fertilidad y la retención de agua y aumenta la productividad de los cultivos (Elad, y otros, 2011).

Sin embargo, también se ha reportado que los beneficios agronómicos del biocarbón varían según el tipo de materia prima de origen y las condiciones del proceso de pirólisis (temperatura, duración, etc.) así como de las condiciones climáticas regionales del lugar de siembra, del estado inicial del suelo y de sus características químicas (Elad, y otros, 2011). Por esta razón es necesario continuar con estudios que permitan esclarecer las propiedades y los efectos de los distintos biocarbón sobre las plantas, la microbiota edáfica y las propiedades fisicoquímicas del suelo.

En este proyecto se evaluó si el biocarbón derivado de cascarilla de arroz obtenido mediante pirólisis a 500° C promueve el crecimiento y productividad de dos especies de cultivo importantes en Colombia y si su efecto se relaciona con una mejora de la fertilidad del suelo y con el aumento y diversidad de las comunidades bacterianas.

2.2 Marco teórico y estado del arte

2.2.1 Impacto ambientales de la agricultura

El crecimiento demográfico de la población humana en las últimas décadas se ha traducido en una mayor demanda de alimentos, lo que ha generado un inmenso desarrollo del sector agrícola (Carvajal & Mera, 2010). La agricultura convencional causa la contaminación y degradación de los suelos (Barrow, 2012), el reto que esto propone es un modelo de Agricultura Conservativa en el ámbito global, que incremente la productividad de los cultivos, a través de la adopción de técnicas y el uso de insumos sostenibles y sustentables (Carvajal & Mera, 2010).

La pérdida de fertilidad del suelo a causa de uso agrícola ha sido compensada con el uso de fertilizantes químicos que aunque aumentan la productividad de los cultivos también traen consigo la contaminación de aguas superficiales y profundas. Además, el uso de abonos químicos hace que las plantas arvenses se desarrollen e impulsen la utilización de herbicidas que a su vez también contaminan el ambiente. La adición sistemática de fertilizantes, con el consiguiente aumento de la productividad, ha tenido como consecuencia que para obtener los mismos resultados conseguidos décadas atrás sea necesario incrementar la dosis de 20 unidades fertilizantes a 240 unidades (Proyecto Life Sinergia, 2005). Todo esto propone un escenario en el que se buscan nuevas alternativas para enfrentar el reto de cultivar y a la vez proteger el medio ambiente.

Desde 1940 la agricultura empezó a sustituir fertilizantes químicos por estrategias alternativas, como los compost y abonos (Barrow, 2012). Sin embargo, estos últimos amenazan con contaminar las aguas subterráneas, pueden contener patógenos y metales pesados, debido a su rápida degradación lo que conlleva a la emisión de gases de efecto invernadero como el metano y el amonio (no actúan como sumideros sino como fuente de gases) (Godbout, y otros, 2010) y representan un costo recurrente para el agricultor (Barrow, 2012). El biocarbón podría ser una alternativa para minimizar estos riesgos y puede ser un insumo clave para elevar y sostener la producción agrícola, mejorar la retención de humedad del suelo, secuestrar carbono, reducir al mismo tiempo la contaminación y dependencia de los fertilizantes industriales que en muchos países son importados lo cual representa un alto costo grave para sus economías (Barrow, 2012), como en el caso de Colombia.

La Convención de las Naciones Unidas de Lucha contra la Desertificación (UNCCD) apoya el uso del biocarbón como un medio para combatir la degradación de la tierra, mejorar las tierras agrícolas y mitigar el cambio climático (Barrow, 2012). Gran parte de las tierras agrícolas de África, América Latina, Asia (austral y sudeste) son ácidas y estériles, a menudo con altos niveles de hierro y de aluminio. Aplicar biocarbón en estos suelos podrían facilitar el cultivo, reducir el

impacto al hacerlo y disminuir la presión de deforestación que acompaña la búsqueda de terrenos cultivables (Barrow, 2012). Asimismo, en la XV Conferencia sobre el Cambio Climático de la ONU 2009 se incluyó al biocarbón como una propuesta para intensificar las medidas de mitigación debido a que tiene un doble papel porque combate tanto el cambio climático, a través de su efecto como sumidero de carbono, como la degradación de las tierras por su efecto sobre la estructura y fertilidad edáfica (Barrow, 2012).

2.2.3 Biocarbón

El biocarbón es un importante subproducto sólido poroso producido por la degradación térmica a altas temperaturas de biomasa animal o vegetal (Jahiru, y otros, 2012) en ausencia de oxígeno durante un proceso conocido como pirólisis lenta (Fisher & Glaser, 2012). La palabra pirólisis deriva de las palabras griegas "piro", que significa fuego y "lisis" que significa descomposición o romper (Jahiru, y otros, 2012). La pirólisis lenta optimiza la producción de biocarbón, a través de una constante velocidad de calentamiento que va desde la temperatura ambiente a altas temperaturas en cuestión de minutos a horas (Downie & Lukas Van, 2013).

El biocarbón es similar al carbón y puede ser producido a partir de una variedad de materias primas de origen biológico (Augustenborg, y otros, 2012) como por ejemplo desechos de cultivo (cascarilla de arroz, mazorcas, paja, entre otros) y materia orgánica en descomposición de origen animal (estiercol de ganado, cerdo, aves de corral, entre otros) (Barrow, 2012).

Por siglos, la biomasa pirolizada se ha utilizado como una enmienda del suelo para aumentar su fertilidad, por ejemplo las tierras oscuras del Amazonas (Terra Preta). Las tierras oscuras del Amazonas deben su color a altos contenidos de biocarbón y generalmente exhiben un alto contenido de materia orgánica, pH ligeramente básico y un mayor nivel de nutrientes (Barrow, 2012) como nitrógeno, fósforo y calcio en comparación con el suelo adyacente (Glaser, 2007). Existe evidencia de que estas tierras se formaron por la actividad antrópica de nativos precolombinos que habitaron la cuenca del Amazonas, a causa de acumulación de los residuos quemados alrededor de las viviendas (Barrow, 2012) junto con abonos, huesos y fragmentos de cerámica (Sombroek, 1966). Las tierras oscuras del Amazonas pueden incrementar la biomasa de la microbiota benéfica (bacterias y hongos micorrízicos arbusculares) y la cantidad de organismos más grandes, especialmente las lombrices de tierra (Barrow, 2012).

2.2.3 Beneficios del Biocarbón

Son numerosos los beneficios del biocarbón, a continuación se indican algunos de ellos:

Beneficios del biocarbón

- ⇒ Mejora el crecimiento de las plantas lo cual incrementa el rendimiento de los cultivos.
- ⇒ Aumenta la biomasa microbiana del suelo y aumenta la cantidad de la macrofauna como las lombrices (Barrow, 2012).
- ⇒ Reduce la acidez del suelo (aumenta el pH).
- ⇒ Aumenta la capacidad de intercambio catiónico.
- ⇒ Secuestra carbono (C) a escala milenaria (Fisher & Glaser, 2012), debido a su estructura aromática y tiempo de residencia (>1000 años) (Augustenborg, y otros, 2012). El biocarbón es un compuesto estable que se degrada lentamente. La agricultura intensiva generalmente conduce una disminución del C del suelo, reduciendo su capacidad de secuestrar C (Sanderman & J, 2010).
- ⇒ Mejora las condiciones de los suelos pobres en nutrientes, como es el caso de los suelos ácidos que se encuentran en América latina y otras partes del mundo (Barrow, 2012).
- ⇒ El biocarbón puede unirse a agroquímicos que contaminan arroyos y aguas subterráneas, actuando como un descontaminante.
- ⇒ Permite la producción de materiales útiles a partir de desechos.
- ⇒ Reduce la necesidad de fertilizantes, abonos y compost (Barrow, 2012).
- ⇒ Reduce las emisiones de metano y de óxido nítrico (gases de efecto invernadero) procedentes del suelo (Augustenborg, y otro, 2012), contribuyendo también de esta manera a la reducción del calentamiento global.
- ⇒ Mejora la retención de humedad del suelo, lo cual puede reducir la demanda de riego de los cultivos e incrementar la resiliencia de los cultivos contra los efectos del calentamiento global (Barrow, 2012).
- ⇒ Mejora la fijación de nitrógeno, a través de su efecto sobre la microbiota.
- ⇒ Reduce la toxicidad del aluminio (por debajo de un pH de 5,5 la concentración de iones de aluminio (Al^{3+}) en el suelo solución aumenta de manera significativa y puede inhibir el alargamiento de la raíz (Kochian 1995)).
- ⇒ Reduce la concentración de metales.
- ⇒ Aumenta la cantidad de hongos micorrízicos arbusculares del suelo (Warnock, y otros, 2007), los cuales promueven la disponibilidad de nutrientes para las plantas especialmente el fósforo (P) (Harrison, 1999).
- ⇒ Un número de estudios han demostrado descensos significativos en la tracción del suelo después de la adición de biocarbón (Elad, y otros, 2011). Estas disminuciones en la tensión del suelo permiten una mejor

penetración de las raíces de los cultivos, y puede reducir los costos asociados con la preparación del suelo (Downie & Zweiten, 2013).

⇒ El biocarbón al enmendar suelos degradados por la actividad agrícola podría rehabilitar la tierra degradada y ayudar a reducir la presión de deforestación de nuevos terrenos cultivables lo cual beneficia la conservación de la biodiversidad (Barrow, 2012).

El biocarbón tiene un efecto sobre las propiedades fisicoquímicas del suelo, Verheijen y otros en el 2010 hicieron un análisis de datos publicados y encontraron un aumento del rendimiento de los cultivos en suelos que inicialmente presentaban pH ácido o neutro al aplicar biocarbón, lo que sugería que este efecto en el rendimiento podría deberse a un efecto similar al encalado (consiste en aplicar sales básicas al suelo para neutralizar la acidez (Espinosa & Molina, 1999)) y a una mejor capacidad de retención de agua del suelo, junto con una mejora en la disponibilidad de nutrientes (Verheijen, y otros, 2010). Es relevante resaltar que el pH de los suelos es muy importante pues afecta la disponibilidad de nutrientes para las plantas (Fisher & Glaser, 2012). Rajkovich y colaboradores en 2011 reportaron una correlación entre el aumento del rendimiento y un mayor contenido de nutrientes (N, P, K, Mg) al aplicar biocarbón al 0,2 y 0,5%. En conjunto, estos reportes indican que el biocarbón no actúa a través de un único efecto, sino que influye sobre distintas propiedades fisicoquímicas del suelo relacionadas entre sí.

Otra de las propiedades fisicoquímicas del suelo asociadas a su fertilidad es la capacidad de intercambio catiónico (CIC), la cual es indicadora de su capacidad de retención de nutrientes (Fisher & Glaser, 2012). CIC se refiere a la capacidad de los suelos para retener cationes en forma intercambiable y por lo tanto disponible para las plantas (Lehmann, 2007). El biocarbón pueden aumentar potencialmente la CIC del suelo, especialmente en suelos arenosos altamente erosionados y pobres en nutrientes (Kookana, 2010).

Además del efecto sobre las propiedades fisicoquímicas, el biocarbón tiene un efecto sobre la microbiota del suelo. Existen numerosos reportes, por ejemplo, Lehmann y colaboradores en el 2011 señalaron que en sus estudios la biomasa microbiana aumentó al aplicar biocarbón al suelo, y que se observó un cambio en composición de las comunidades microbianas y la actividad enzimática tanto en el suelo como en la rizósfera (Lehmann, y otros, 2011). Aún se desconocen los detalles sobre el mecanismo por el cual el biocarbón afecta la abundancia y composición de las comunidades bacterianas (Lehmann, y otros, 2011), pero lo que sí se conoce es el papel biofertilizante que cumplen las bacterias edáficas en el crecimiento vegetal.

El efecto del biocarbón sobre la fertilidad del suelo está relacionado con la gran área de superficie de sus partículas, pues al tener numerosos poros proporcionan un micro-hábitat para el establecimiento de microorganismos beneficiosos del

suelo (que degradan la materia orgánica proporcionando importantes nutrientes para el crecimiento vegetal (Fisher & Glaser, 2012)) y permite la retención de humedad y nutrientes (Lehmann & Joseph, 2009). La retención de humedad y nutrientes estimula el crecimiento de la microbiota, dentro de ellas las bacterias fijadoras de nitrógeno de vida libre las cuales aprovechan el N_2 atmosférico y lo fijan en compuestos que pueden ser aprovechados directamente por las plantas (Fisher & Glaser, 2012).

El efecto del biocarbón sobre el crecimiento de las plantas se ha reportado en numerosos estudios, en los cuales se han empleado biocarbones derivados de diferentes materias primas y se ha evaluado el efecto sobre distintas especies de cultivo. En el 2009 Asai H. y colaboradores, realizaron un estudio en el norte de Laos en el que evaluaron el efecto de la biocarbón sobre las propiedades físicas del suelo y el rendimiento del arroz (*Oryza sativa*), obteniendo como resultado un mayor rendimiento en suelos con baja disponibilidad de nutrientes tratados con biocarbón (Asai, y otros, 2009). En 2012 Petter y colaboradores, realizaron un experimento por dos años evaluando los efectos en la fertilidad del suelo al aplicar biocarbón derivado de *Eucalyptus*, usaron plantas de arroz plantadas en un suelo franco arenoso del Cerrado (Brasil) que son generalmente ácidos y de baja fertilidad (baja disponibilidad de P, K y CIC), y alto contenidos de aluminio. Este grupo de estudio encontró un efecto positivo en la fertilidad del suelo [Total de carbono orgánico (TOC), Ca, P, Al, H+Al, y pH] a 0-10 cm de profundidad del suelo tras un año de la aplicación del biocarbón, lo cual tuvo un efecto considerable en el rendimiento del cultivo. Luego de dos años de la aplicación se evidenció una interacción significativa entre el biocarbón y la fertilidad en el crecimiento de la planta y acumulación de biomasa, además TOC se movió hasta una profundidad de 20 cm afectando la disponibilidad de potasio (K). Este es otro claro ejemplo de como la aplicación del biocarbón mejora las propiedades del suelo, reduce la acidez y el aumento P y K disponible (Petter, y otros, 2012).

2.2.4 Limitantes del biocarbón

Dado que el biocarbón tiene una residencia de largo tiempo en el suelo y afecta a los microorganismos beneficiosos del suelo, es necesario establecer si sus cualidades son persistentes en el tiempo (Barrow, 2012), para poder implementarlo como una estrategia de mitigación ambiental en la agricultura moderna. Es importante caracterizar cada tipo de biocarbón antes de su aplicación al suelo, no sólo en términos de las contribuciones favorables, sino también en términos de los riesgos eco-toxicológicos (Kloss, y otros, 2012). Diversas investigaciones reportan que el biocarbón tienden a reducir la biodisponibilidad y la eficacia de pesticidas, en consecuencia, puede influir en la sorción – asociación de compuestos químicos con el suelo- de pesticidas (disminuye la disponibilidad y eficiencia de los plaguicidas) y otros contaminantes orgánicos del suelo generando un impacto ecotoxicológico (Kookana, 2010). Sin embargo, se requieren más estudios para dilucidar mejor este tema.

Otra limitante para la adopción del biocarbón es la gran variabilidad en las características del biocarbón como función de materias primas y de las condiciones de pirólisis, lo que resulta en diferentes impactos en la respuesta de la planta (como la concentración de elementos constituyentes, densidad, porosidad y dureza) (Spokas, y otros, 2012; Elad, y otros, 2011). A esto se le suma que las condiciones regionales incluidos el clima, y las características físicas y químicas del suelo influyen sobre los beneficios agronómicos del biocarbón. Por estas razones es necesario continuar con estudios que aporten información sobre las características y efectos del biocarbón.

2.2.5 Microorganismos del suelo

La fitosfera es un hábitat atractivo para los microorganismos debido a la disponibilidad de muchos nutrientes y la estabilidad ambiental (Ikeda, y otros, 2009). Dentro de ella hay una zona llamada rizósfera que se define como la estrecha zona del suelo que rodea las raíces de las plantas (liberan C), en ella se observa una gran actividad microbiana en comparación al suelo que no hace parte de esta área (Tarkka, y otros, 2008). Existe un grupo de bacterias que habitan la rizósfera denominadas rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal (PGPR) (Tarkka, y otros, 2008). Estas bacterias promueven el crecimiento de las plantas mediante la movilización de nutrientes inorgánicos, la fijación de nitrógeno y la producción de fitohormonas incluyendo auxinas, citoquininas y sustancias volátiles, tales como butanodiol (Tarkka, y otros, 2008). Además, los microorganismos son fundamentales en varios procesos biogeoquímicos pues juegan un papel crucial en el reciclaje de la materia orgánica o contribución a la transferencia de energía en las redes alimentarias (Duarte, Cássio, & Pascoal, 2012).

Se considera que la estructura porosa del biocarbón juega un papel muy importante en el aumento de biomasa microbiana, puesto que genera microhábitats que son aprovechados por estos microorganismos (Lehmann & Joseph, 2009). Y muchos de estos microorganismos del suelo tienen alto impacto en la productividad de las plantas. Es por esto que se dilucida una interacción planta-bacteria-biocarbón.

2.2.6 Metodología para evaluar la abundancia y diversidad de bacterias en el suelo

Los estudios sobre la diversidad bacteriana son escasos y limitados a los generos cultivables o al número de diferentes morfotipos. La incapacidad de generar cultivos puros para la mayoría de bacterias limita el conocimiento sobre la biodiversidad bacteriana, pues estas técnicas solo nos permiten conocer una fracción muy pequeña (<1%) de las bacterias del suelo (Martin & Colleen, 1998). Así que las técnicas microbiológicas tradicionales resultan ser insuficientes para examinar la composición de las comunidades microbianas, por lo tanto las

técnicas moleculares en la actualidad resultan ser herramientas muy poderosas para conocer un mayor porcentaje de las comunidades bacterianas, dentro de ellas la técnica DGGE de la cual se habla en la siguiente sección (Duarte, Cássio, & Pascoal, 2012).

El gen ribosomal 16S rARN se utiliza frecuentemente como marcador filogenético. Este gen ha permitido conocer la gran diversidad genética de las bacterias que ahora se suben a la base de datos ribosomal Proyecto-II. Hasta el 2008 habían aproximadamente 418 000 secuencias de genes (Mühling, Woolven-Allen, Murrell, & Joint, 2008). Este gen presenta tanto regiones hipervariables que permiten estimar la diversidad bacteriana, como regiones altamente conservadas que permiten discriminar a las bacterias de otro grupo de organismos (Větrovský & Baldrian, 2013).

La metagenómica consiste en generar librerías genómicas con fragmentos de ADN de todos los organismos de una muestra. Las librerías genómicas han sido exitosas en la detección de nuevos clados bacterianos o la comparación de diferentes ambientes marinos en términos de composición de la comunidad bacteriana. Sin embargo, a pesar de la disminución de los costos para la secuenciación de nucleótidos, el éxito de este enfoque es aún limitado porque la enorme escala de diversidad bacteriana, por lo tanto muchos estudios emplean otras metodologías como DGGE antes de realizar análisis metagenómicos (Mühling, Woolven-Allen, Murrell, & Joint, 2008).

En cuanto al análisis la abundancia bacteriana, existen distintas metodologías directas o indirectas para estimar la biomasa microbiana. Algunos métodos indirectos se basan en la respiración microbiana como por ejemplo midiendo el nivel del dióxido de carbono presente en el suelo ya que es una medida de la actividad de los organismos del suelo (FAO e IFA, 2002). Otro método es el número de bacterias cultivables determinado por un conteo en placa. No obstante, en la actualidad se prefieren técnicas de tinción usando fluorocromos como el DAPI, ya que resulta ser el método más acertado para la enumeración de bacterias totales presentes en una muestra, esta técnica se detallará en la sección de DAPI.

2.2.7 DGGE

Para separar productos de PCR de una misma longitud pero con diferentes composiciones de nucleótidos se usa una electroforesis en gel de acrilamida empleando un gradiente de desnaturalización, DGGE. Este gel presenta unas condiciones de desnaturalización proporcionadas por los volúmenes de urea y formamida (Duarte, y otros, 2012). El número de bandas en el gel representa la diversidad genética de la muestra (Muyzer, y otro, 1993). Algunas investigaciones simuladas aseguran que el 95% de cambios en una sola base de los fragmentos pueden ser detectados por esta técnica (Myers, y otros, 1985).

Durante la desnaturalización, las dos hélices de ADN se separan. Pero es necesario que las moléculas no se desnaturen completamente, ya que de ser así el ADN monocatenario correría por el gel y no permitiría obtener la banda correspondiente. Para impedir esta pérdida de muestra se le añade una abrazadera de GC (40-60 nucleótidos) en el extremo 5' de uno de los cebadores de PCR, generando en un extremo del fragmento un alto punto de fusión, lo que permite que la muestra se adhiera al gel (Duarte, y otros, 2012).

La técnica de DGGE es rápida y económica, puesto que en un lapso de pocas horas permite obtener una imagen de la diversidad y la estructura de las comunidades microbianas presentes en la muestra (Watanabe, y otros, 2004); en comparación con otras técnicas de huella genética como T-RFLP que implica el uso de un secuenciador de ADN que representaría mucho más tiempo y costos (Duarte, y otros, 2012). Otra ventaja de la técnica de DGGE es que se puede determinar la abundancia de taxones específicos por medio de la intensidad de las bandas (Nikolcheva, y otros, 2003). Además, esta técnica permite obtener información taxonómica luego de ser revelado el gel, puesto que permite recortar una de las bandas del gel re-amplificarla y secuenciarla, para obtener mayor información de interés y específica (Duarte, y otros, 2012).

Las principales desventajas de utilizar DGGE son las mismas que presentan todas las técnicas basadas en el ADN que son la poca eficiencia de extracción de ADN, los sesgos de PCR y la introducción de contaminantes durante la extracción del ADN y PCR (Muyzer, y otros, 2004). Además, distintas secuencias de ADN pueden migrar a un mismo sitio en el gel debido a un contenido similar de GC, por ello una banda no necesariamente puede representar una especie (Duarte, y otros, 2012).

Aunque el análisis de fragmentos por DGGE tiene sus limitaciones, es importante mencionar que puede usarse como un acercamiento premetagenómico para comparar dos o más muestras. Si las muestras difieren en los patrones de bandas, entonces las comunidades bacterianas (generalmente se usa el gen 16S rARN para su estudio) se catalogarían como diferentes, pero si exhiben patrones de bandas similares se puede corroborar al realizando análisis adicionales (Jackson, y otros, 2000).

Para analizar el gel resultante de la técnica del DGGE se usan programas especializados como GelCompar II y Bionumerics (<http://www.applied-maths.com/>) que son los más usados y permiten la caracterización de los patrones de bandas (Rademaker & de Bruijn, 2004).

2.2.8 DAPI

Es de gran relevancia conocer el número de bacterias si se desea estudiar la dinámica de las comunidades bacterianas. Una técnica que gana cada vez más acogida es el uso de fluorocromos que se unen al material genético y hacen visible la presencia de microorganismos, un ejemplo de ellos es DAPI.

El DAPI es un marcador fluorescente de ADN útil para estudios del ciclo celular o enumeración de protistas unicelulares y bacterias. Este fluorocromo tiñe los nucleótidos y es permeable a la membrana celular, tiñendo tanto a células muertas como viables (Kerrison & Steinke, 2010), lo cual le confiere cierta ventaja de los métodos de fluorescencia frente a los demás métodos. El DAPI se une preferiblemente a regiones ricas en A-T y no es un intercalante, emite un color azul con un máximo de excitación a una longitud de onda de 365nm (Yu, y otros, 1995).

Esta tinción no es específica para bacterias sino que tiñe indiscriminadamente el material genético, por ello es necesaria la identificación de grupo bacteriano de acuerdo a su forma y tamaño (Kepner & Pratt, 1994).

2.3 Objetivos

2.3.1 Objetivo General

Evaluar el efecto de la aplicación de biocarbón al suelo sobre la productividad de especies de cultivo seleccionadas (*Oryza sativa*, arroz y *Capsicum annuum*, ají) y sobre la abundancia y diversidad de comunidades bacterianas.

2.3.2 Objetivos Específicos

1. Determinar el efecto de aplicar biocarbón al suelo sobre la productividad de especies de cultivo.

Indicadores:

Biomasa (granos, tallos, hojas y panículas), altura (planta y panículas) y número de panículas, tallos y hojas.

2. Calcular la abundancia y diversidad bacteriana en suelos en los cuales se ha aplicado biocarbón.

Indicadores

Abundancia: Total de células contadas (células. g⁻¹ suelo) y promedio de células contadas utilizando la técnica de fluorescencia con marcador DAPI

Diversidad: Número de bandas en perfil electroforético obtenido a partir de ADN extraído del suelo, empleando la técnica de DGGE para la separación de fragmentos amplificados del gen 16S rARN. Cálculo de índices de diversidad a partir del patrón electroforético empleando el programa GelCompare II.

3. Evidenciar los cambios en fertilidad del suelo asociados a la aplicación de biocarbón.

Indicadores: Contenido de sodio, fósforo, potasio, calcio, magnesio, aluminio, capacidad de intercambio catiónico y pH.

2.4 Metodología

2.4.1 Obtención Biocarbón

En este estudio se utilizó biocarbón derivado de cascarilla de arroz, producido por la arrocería La Esmeralda (Jamundí, Valle del Cauca, Colombia), el cual es producido mediante pirólisis controlada por 3 horas a 500 °C.

2.4.2 Material vegetal

Se usaron semillas de arroz *Oryza sativa* spp. japónica cv. Azucena (Familia: Poaceae) y semillas comerciales de Ají jalapeño *Capsicum annuum* (Familia: Solanácea) de la marca Fercon.

Para esterilizar las semillas se agitaron en una solución de hipoclorito al 2,5% calentando a 37 °C, por media hora. Luego se realizaron tres lavados con agua, agitando 5 min por cada enjuague. Luego se incubaron las semillas a 37 °C por 72 horas (para el ají se extendió el tiempo de incubación ya que a las 72 horas las semillas no habían germinado).

2.4.3 Diseño experimental y tratamientos

Con el fin de evaluar la interacción planta-bacteria-biocarbón y su efecto sobre la productividad de dos especies de cultivo se implementó un diseño factorial de dos factores y dos niveles como se detalla a continuación (Tabla 1).

Tabla 1. Detalles del diseño experimental y de los tratamientos establecidos para realizar el experimento

Diseño experimental	
Factor	Nivel
Aplicación de biocarbón	+ Biocarbón
	- Biocarbón (Control)
Esterilización del suelo	Estéril
	No estéril (Control)
Tratamientos	
1. Suelo control (SC)	
2. Suelo control + Biocarbón (SC+B)	
3. Suelo estéril (SE)	
4. Suelo estéril + Biocarbón (SE+B)	

A cada uno de estos tratamientos se le asignaron 14 plantas ($n=14$) (excepto el tratamiento (SE+B) que presentaba 15 plantas) en el caso del arroz y para el ají fueron 9 plantas ($n=9$). En cada caso, se seleccionaron plantas con características homogéneas (altura, número de hojas, vigor) y se distribuyeron al azar entre los distintos tratamientos.

En el caso del arroz, cada unidad experimental consistió de un cilindro de policloruro de vinilo (PVC) con un diámetro de 7,7 cm y una altura de 30cm. Dependiendo del tratamiento, los cilindros fueron llenados con suelo, o con suelo y una mezcla de biocarbón y suelo (Proporción 1/10) aplicada de forma superficial hasta una profundidad de 5 cm. Se establecieron cinco tiempos de muestreo para la recolección de suelo y la documentación fotográfica del crecimiento de las plantas (0, 30, 60, 90 y 120 días).

Para el ají se usaron semilleros de 7cm de profundidad y al igual que en el caso del arroz, los recipientes fueron llenados con suelo, o con suelo y una mezcla de biocarbón-suelo (Proporción 1/10) aplicada de forma superficial hasta una profundidad de 1,2cm. Las evaluaciones se limitaron al registro fotográfico debido a problemas con la germinación y supervivencia de las plantas.

El experimento se realizó bajo condiciones semi-controladas en la casa de malla de la Facultad de Ciencias Naturales de la Universidad Icesi.

2.4.4 Origen de suelo, esterilización del suelo y validación de esterilidad

El suelo usado fue suelo de vivero, cuyas características fisicoquímicas se detallan en la Tabla 7. Para su esterilización, se separó el suelo en varias bolsas resistentes al calor y se autoclavó cinco veces, a 121°C durante 1 hora (Figura 1). Para validar la esterilidad del suelo, se extrajo un gramo de suelo de cada bolsa y se mezcló con 10mL de una solución de NaCl al 0.85% suplementada con peptona al 1%, se agitó por 1 hora. Luego se tomó una alícuota de 200 μL y se inoculó de manera superficial en agar nutritivo. Los cultivos se incubaron durante 24-48 horas hasta observar crecimiento de colonias bacterianas. La ausencia de crecimiento se tomó como prueba de esterilidad (Figura 2).

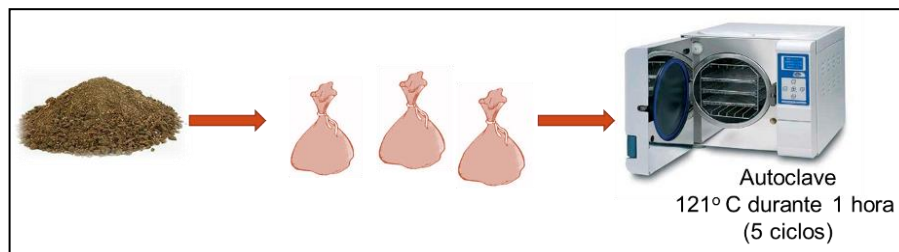


Figura 1. Diagrama del proceso de esterilización del suelo

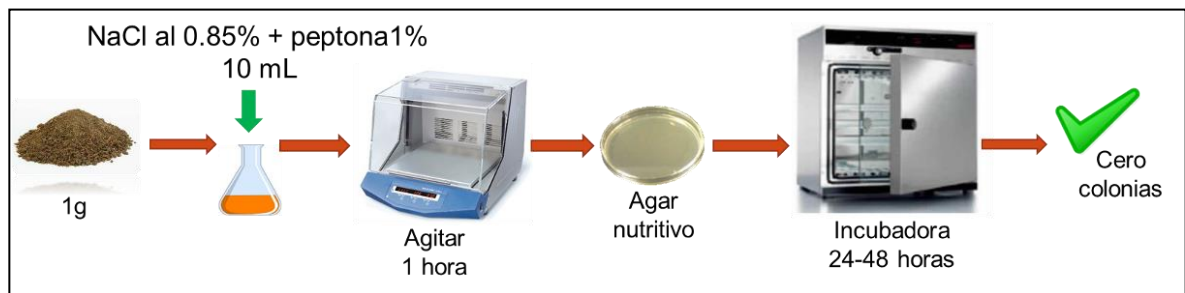


Figura 2. Diagrama del proceso de validación de esterilidad del suelo

2.4.5 Muestreo del suelo para análisis de abundancia y diversidad de bacterias

Para realizar los análisis moleculares y microbiológicos se tomaron muestras de suelo a una profundidad de 10 cm de tres plantas distintas en cada tiempo de muestreo (0, 30, 60, 90 y 120 días). Las muestras se colectaron en bolsas herméticas y se almacenaron a 4° C hasta ser analizadas.

2.4.6 Análisis de abundancia de bacterias

Se realizó un conteo directo de células usando la tinción fluorescente con el colorante 4',6-diamidino-2-fenilindole (DAPI), para determinar la abundancia bacteriana.

En esta metodología, se tomó una alícuota de la solución bacteriana obtenida mediante centrifugación diferencial con un gradiente de Nycondenz (a partir de 15g de suelo). Para el protocolo de centrifugación diferencial utilizando Nycodenz (1.3%), se homogenizó 15g de suelo en 15mL de solución NaCl 0.9% mediante agitación por 15 min, luego se centrifugó a 700 g por 15 min a 10°C y se colectó el sobrenadante al filtrarse a través de una gasa -previamente saturada con NaCl 0.9%-, este proceso de agitación se repitió tres veces (Poté, y otros, 2010). Posteriormente, este sobrenadante colectado y filtrado se centrifugó a 7500 g por 20 min a 10 °C obteniéndose un pellet. Se descartó el sobrenadante y el pellet se suspendió en 10mL de NaCl 0.9%. La resuspensión fue transferida cuidadosamente a un tubo falcón que contenía 5mL de Nycodenz (previamente enfriado a 4°C) y se sometió a tres centrifugaciones secuenciales usando el rotor pivotante a 1000 g, 2000 g y 4500 g por 40 min a 4°C, lo que permitió un enriquecimiento de distintas fracciones bacterianas (Poté, y otros, 2010) y la obtención de un anillo a partir de estas fracciones. Finalmente se rescató el anillo bacteriano y se resuspendió en 400µL de agua estéril, seguido por centrifugación a 10 000 g por 30 min para eliminar los residuos de Nycodenz. Se descartó en sobrenadante y el pellet resultante se resuspendió en 250 µL de agua destilada.

Para el conteo de bacteria, la resuspensión del anillo bacteriano (250 μL) se mezcló con 800 μL de formaldehido-PBS 20% (agente fijador) y las muestras se incubaron a 37°C por 2 horas. Después, se agregó 20 μL de una dilución 1 mg/mL de DAPI, y se dejó teñir por 15min. La solución se filtró al vacío usando una membrana de celulosa, que posteriormente se cortó y se colocó en un portaobjeto cubierta con un cubreobjetos. Las membranas fueron observadas y fotografiadas bajo el microscopio de fluorescencia (Figura 3). El conteo de microorganismo se realizó de forma automática usando el programa ImageJ (<http://imagej.nih.gov/>). La abundancia de bacterias presentes en el suelo se calculó empleando la ecuación

$$TCC = \frac{(MTCC)(CM)(FD)}{V_m}$$

Donde,

TCC: Total de células contadas (células/ g de suelo)

MTCC: Promedio de células contadas

CM: Campos microscópicos

FD: Factor de dilución

V_m : Volumen o gramos de muestra analizados

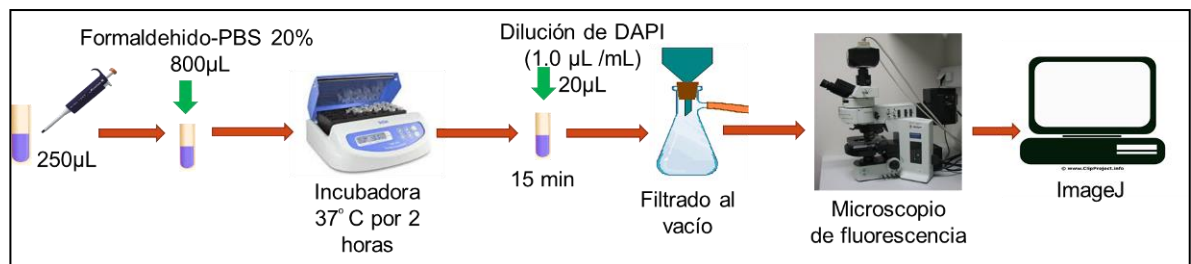


Figura 3. Diagrama del proceso de tinción y visualización de bacterias usando DAPI

2.4.7 Extracción de ADN bacteriano

Para la extracción de ADN bacteriano se usó el Kit UltraClear Soil DNA Isolation (MoBio Laboratories, Inc, USA). Sin embargo, para lograr una mejor purificación se realizaron lavados iniciales con tres soluciones tampón (buffers), cuya composición se muestra en la Tabla 2. De manera sucesiva, a la muestra de suelo (400 mg) se añadió 1mL de solución tampón, se mezcló con ayuda de un vortex por 30 s, se invirtió manualmente por 90s, se centrifugó a 3000g por 5min a 4°C y finalmente se removió el sobrenadante (Whyte & Greer, 2005). Posteriormente se procedió a la extracción de ADN siguiendo las recomendaciones del kit.

Tabla 2. Composición de las soluciones tampón empleadas para el lavado de las muestras de suelo, priori a la extracción de ADN

Solución	Composición
1	Tris-HCl (50mM), NaCl (200mM), EDTA (5mM), Triton X-100 (0,05%).
2	Tris-HCl (50mM), NaCl (200mM), EDTA (5mM).
3	Tris-HCl (10mM), EDTA (0,1mM).

La verificación de la calidad del ADN extraído se comprobó mediante electroforesis en un gel de agarosa al 0.8%, corrido por 20 min a 82 voltios. La cuantificación de ADN se realizó mediante el uso del equipo Nanodrop 2000 (Thermo Fisher Scientific Inc).

2.4.8 Análisis de diversidad bacteriana

Para la determinación de la diversidad bacteriana se amplificó un fragmento de la región V3 del gen 16S rARN. Las condiciones para la PCR se muestran en la Tabla 3. Se incluyeron dos controles positivos (*Escherichia coli* y *Pantoea agglomerans*) y un control negativo. Se realizó una comprobación de las amplificaciones en geles de agarosa al 1%, corridos por 20 min a 82 voltios.

Tabla 3. Condiciones de PCR para la amplificación del gen 16S rARN a partir de ADN extraído de muestras de suelo

Paso	Temperatura (°C)	Tiempo (min)	Actividad
1	95	5	Desnaturalización inicial
2	94	1	Desnaturalización
3	63	1	Alineamiento
4	72	45 seg	Extensión
5	72	10	Extensión final

*Se realizaron 20 ciclos del paso 2 al 4.

La separación de los fragmentos se realizó mediante electroforesis en gel de acrilamida con un gradiente denaturante 45-55%. La electroforesis se corrió con voltaje constante de 100 V y temperatura de 60°C por 18 horas. El revelado de los geles de acrilamida se realizó usando Sybr Gold mezclado con buffer TAE 0,5X. El análisis de los patrones de bandas se realizó usando el software GelCompare II (Figura 4).

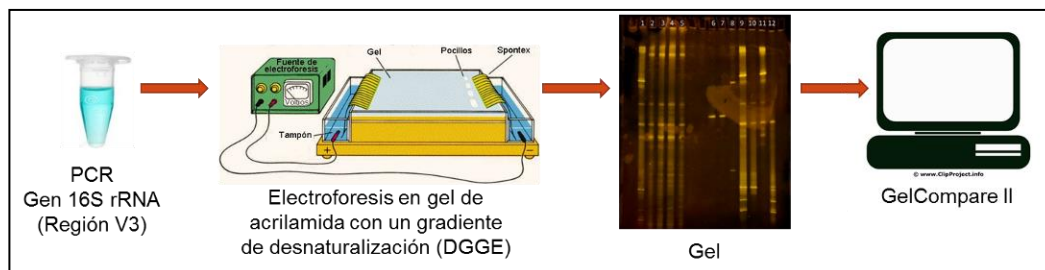


Figura 4. Diagrama del análisis de diversidad bacteriana usando la técnica de DGGE

2.4.9 Análisis fisicoquímico del suelo

El análisis de las características fisicoquímicas del suelo se realizó en colaboración con el Laboratorio de Servicios Analíticos del CIAT. Se tomaron muestras de los distintos tratamientos al inicio (día 0) y final del experimento (día 120).

2.4.10 Medidas de crecimiento y productividad

El crecimiento de las plantas de arroz y ají fue monitoreado semanalmente durante el experimento y documentado mediante registro fotográfico.

Para el arroz, al final del experimento (125 días) se cuantificó el número de tallos, número de panículas, número de hojas, número de panículas, número de granos, altura de la planta, longitud de panículas, biomasa de tallos, biomasa foliar, biomasa de panículas y biomasa de 100 granos, siguiendo los protocolos establecidos en el Sistema Estándar de Evaluación de arroz (SES) (Rice Research Institute, 2002).

Para el ají, sólo se realizó el registro fotográfico debido a problemas de supervivencia de las plantas que afectaron el número de réplicas de los distintos tratamientos.

2.4.11 Análisis estadístico

El efecto de los tratamientos sobre las variables altura, biomasa foliar, peso de panículas, número de hojas, biomasa de tallos, peso total de granos, número de granos, peso de 100 granos, porcentaje de granos llenos y longitud de panículas se analizó empleando un ANOVA de una vía, pues las variables cumplieron con los supuestos de homogeneidad de varianza y distribución normal. Para las variables número de hojas, biomasa de tallos y longitud de panículas, los datos fueron ajustados a la distribución normal, empleando la transformación de Johnson.

Las variables de número de tallos y número de panículas se analizaron empleando estadística no paramétrica, puesto que no satisfacían el supuesto de normalidad.

Todos los análisis se realizaron empleando el software Minitab 17 (Minitab INC.).

Tabla 4. Matriz lógica

Objetivo General			
Evaluar el efecto de la aplicación de biocarbón al suelo sobre la abundancia y diversidad de comunidades bacterianas y sobre la productividad de especies de cultivo seleccionadas arroz (<i>Oryza sativa</i>) y ají (<i>Capsicum annuum</i>).			
Objetivos Específicos	Actividades	Indicadores	Supuestos
1. Determinar la abundancia y diversidad bacteriana en suelos en los cuales se ha aplicado biocarbón.	Abundancia: 1. Tomar una alícuota de solución bacteriana obtenida por el protocolo de enriquecimiento con Nycodenz 2. Teñir con DAPI 3. Filtrar al vacío 4. Observar al microscopio de fluorescencia 5. Analizar usando el programa ImageJ	Abundancia: -Número total de células contadas (células. g-1 suelo) -Promedio de células contadas	-Equipos funciones correctamente -Reactivos necesarios y que se encuentren en buen estado -Exitosa extracción de ADN del suelo
	Diversidad: 1. Extraer ADN del suelo 2. Amplificar un fragmento del gen 16S rARN 3. Realizar electroforesis en gel de acrilamida empleando un gradiente de desnaturalización (DGGE) 4. Teñir con Sybr Gold 5. Analizar usando el programa GelCompare II.	Diversidad: -Número de bandas -Índices de diversidad	
2. Evaluar el efecto de aplicar biocarbón al suelo sobre la productividad de especies de cultivo.	1. Usar una balanza se obtienen las distintas biomásas	-Biomasa de hojas -Biomasa de tallos -Biomasa de granos	-El equipo funcione correctamente
3. Evaluar los cambios en fertilidad del suelo asociados a la aplicación de biocarbón.	1. Enviar la muestra al CIAT (Centro Internacional de Agricultura Tropical)	-Contenido de materia orgánica, K, Ca, Na, Mg, Al y P. -CIC -pH	- La muestra permita obtener las distintas mediciones

Tabla 5. Cronograma de actividades

Actividad	Noviembre	Diciembre	Enero	Febrero	Marzo	Abril	Mayo	Junio	Julio
<i>Revisión bibliográfica</i>									
<i>Pedido de reactivos</i>									
<i>Periodo de incubación de la muestra</i>									
<i>Medidas de abundancia</i>									
<i>Medidas de diversidad</i>									
<i>Medida de productividad</i>									
<i>Caracterización fisicoquímica del suelo y el biocarbón</i>									
<i>Escritura del informe</i>									

2.5 Resultados

2.5.1 Confirmación de presencia de bacterias en el suelo y validación del proceso de esterilidad

En este estudio, se compararon cuatro tratamientos experimentales basados en un modelo factorial con dos factores (suelo control y suelo estéril) y dos niveles (+biocarbón, -biocarbón). Antes de someter a las plantas a los tratamientos, se procedió a: 1) Confirmar la presencia de bacterias en el suelos control y 2) Validar que el proceso de esterilización del suelo, efectivamente eliminó a los microorganismos del suelo.

Para comprobar la presencia de microorganismos en el suelo se procedió a aislar la fracción cultivable de bacterias del suelo control y se observó la presencia de diferentes morfotipos bacterianos empleando diluciones seriadas del aislamiento sembradas en medio nutritivo sólido (Figura 5).

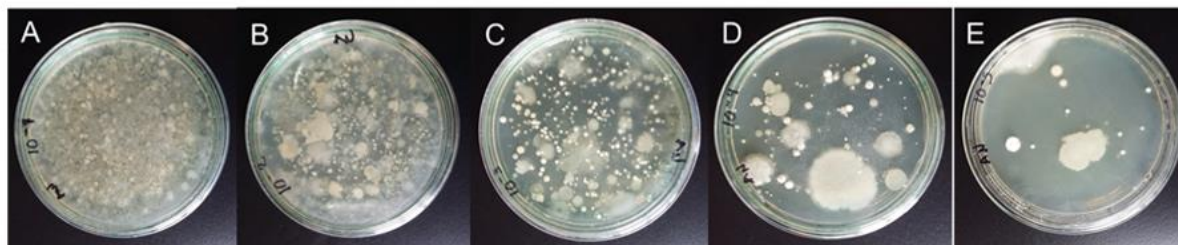


Figura 5. Bacterias cultivables presentes en el suelo control (no estéril), observadas luego de diluciones seriadas de la fracción bacteriana aislada del suelo. (A) Dilución 10-1, (B) 10-2, (C) 10-3, (D) 10-4 y (E) 10-5.

La esterilidad del suelo empleado en los tratamientos SE y SE + B, se verificó empleando el mismo procedimiento. En este caso, no se observaron colonias bacterianas (Figura 6) lo que indica que el proceso de esterilización fue efectivo.

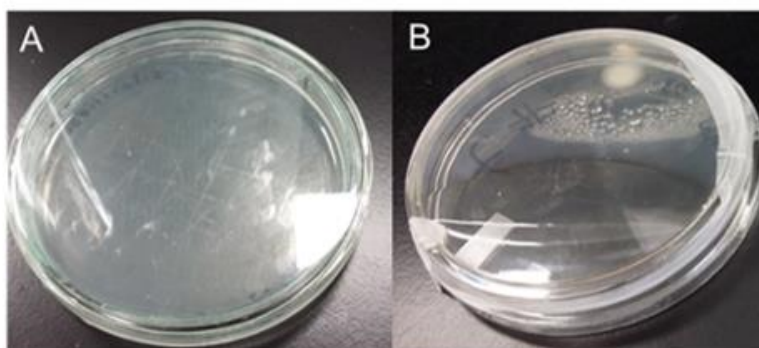


Figura 6. Validación de esterilidad para el suelo empleado en tratamientos SE y SE + B. (A) Suelo estéril usado para el experimento del ají, (B) Suelo estéril usado para el experimento de arroz.

2.5.2 Efecto de la aplicación de biocarbón derivado de cascarilla de arroz sobre el crecimiento de *Capsicum annuum* (ají).

Las semillas de ají desde el proceso de germinación presentaron algunas limitaciones, por ejemplo, requirieron más tiempo de incubación para germinar y su porcentaje de germinación fue bajo en comparación con las semillas de arroz. Esto determinó diferencias en el desarrollo de las plantas desde el inicio hasta el final del experimento, pues solo algunas pocas plantas llegaron a producir frutos. Transcurridos 50 días luego de la aplicación de los distintos tratamientos (DDT) las plantas de ají mostraban clorosis en sus hojas y tallos débiles. Por estas razones sólo se tomó registro fotográfico de este experimento (Figura 7) y no se realizaron mediciones cuantitativas del crecimiento ni los análisis microbiológicos inicialmente previstos para esta especie.

La heterogeneidad de desarrollo observada en las plantas desde el inicio del experimento, no permite concluir sobre el efecto del biocarbón derivado de la cascarilla de arroz en esta especie (Figura 7).

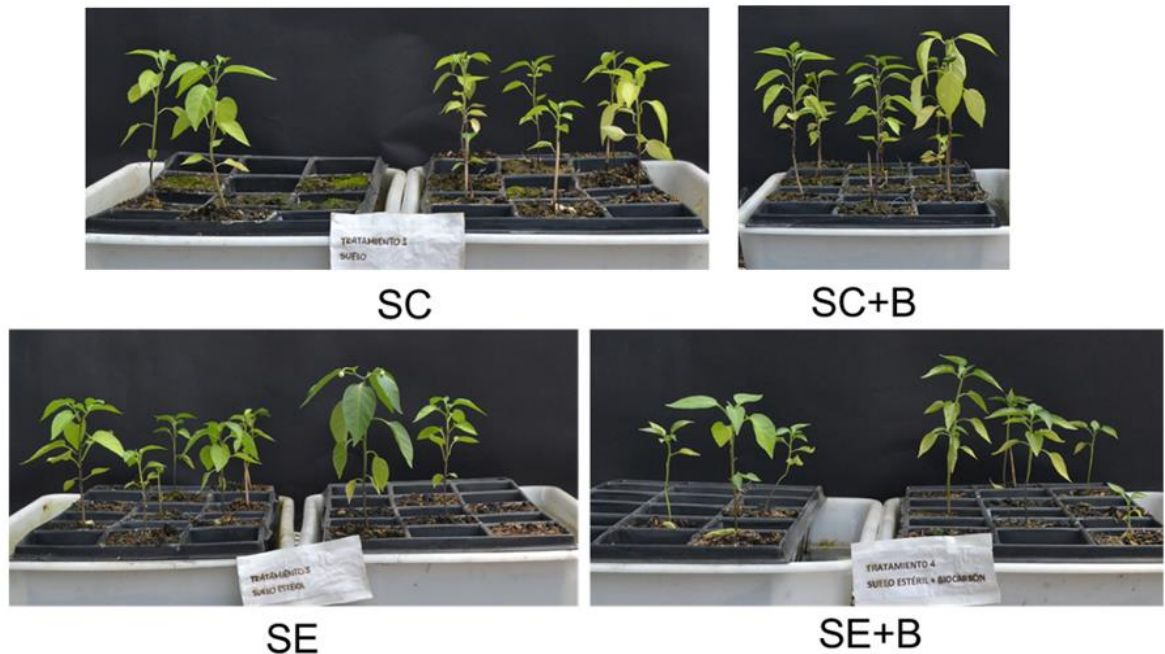


Figura 7. Desarrollo de las plantas de ají, luego de estar sometidas a los distintos tratamientos durante 108 días.

2.5.3 Efecto de la aplicación de biocarbón derivado de cascarilla de arroz sobre el crecimiento de *Oryza sativa* cv. Azucena

El crecimiento de las plantas de arroz fue monitoreado semanalmente durante el experimento y documentado mediante registro fotográfico a 56, 64, 71, 90 y 125 DDT (Figuras 8 y 9).

Al inicio del experimento, se seleccionaron plantas con características homogéneas en relación a la altura, número de hojas y vigor, las cuales se distribuyeron aleatoriamente entre los distintos tratamientos. El efecto de los tratamientos aplicados fue evidente a partir de 40 DDT. Si bien todas las plantas mostraban un aspecto saludable, aquellas cultivadas sobre suelo estéril (tratamiento SE) exhibían un menor desarrollo de biomasa aérea en comparación con las plantas cultivadas en el suelo control (SC). La aplicación de biocarbón promovió el crecimiento de las plantas tanto en SE (tratamiento SE + B) como SC (SC + B), pero su efecto fue mayor en las plantas cultivadas en SE (Figuras 8 y 9). Las diferencias observadas entre los tratamientos en relación al desarrollo de la biomasa aérea de las plantas disminuyeron a través del tiempo, aunque se

detectaron diferencias estadísticamente significativas para distintos parámetros de crecimiento al momento de la cosecha, como se describirá posteriormente.

El impacto de los tratamientos sobre el desarrollo de las raíces se evaluó cualitativamente al final del experimento (Figura 10). Las plantas cultivadas en SE mostraron un limitado desarrollo radicular en comparación con las plantas mantenidas en SC. En estas plantas, la adición de biocarbón (SE+B) promovió el desarrollo radicular. En contraposición, las plantas en el tratamiento SC+B exhibieron una menor producción de raíces, comparadas con su control (SC).

Las plantas sometidas a los tratamientos SC, SC+B y SE+B alcanzaron 50% de floración a los 87 DDT (Tabla 6). En el tratamiento SE se observó un ligero retraso (2-3 días) en la emergencia de las panículas.

Tabla 6. Número de días para alcanzar el 50% de floración en los distintos tratamientos

PORCENTAJE DE FLORACIÓN (%)				
DDT	SC	SC+B	SE	SE+B
85	21,43	7,14	0,00	26,67
86	21,43	14,29	0,00	26,67
87	42,86	35,71	14,29	40,00
89	78,57	71,43	42,86	60,00
90	78,57	92,86	42,86	80,00



Día 56



Día 64



Día 71



Día 90



Día 125

Figura 8. Diferencias de desarrollo exhibidas por las plantas de arroz bajo los cuatro tratamientos experimentales.

Panel superior, de izquierda a derecha: SC+B, SC, SE+B y SE.

Panel inferior de izquierda a derecha: SC+B, SE+B, SC y SE.

Las fotografías fueron tomadas a los 56, 64, 71, 90 y 125 DDT.



SC



SC+B



SE



SE+B

Figura 9. Uniformidad de respuesta de crecimiento de las plantas de sometidas a los distintos tratamientos. Se muestran la totalidad de plantas bajo cada tratamiento luego de 56 DDT.

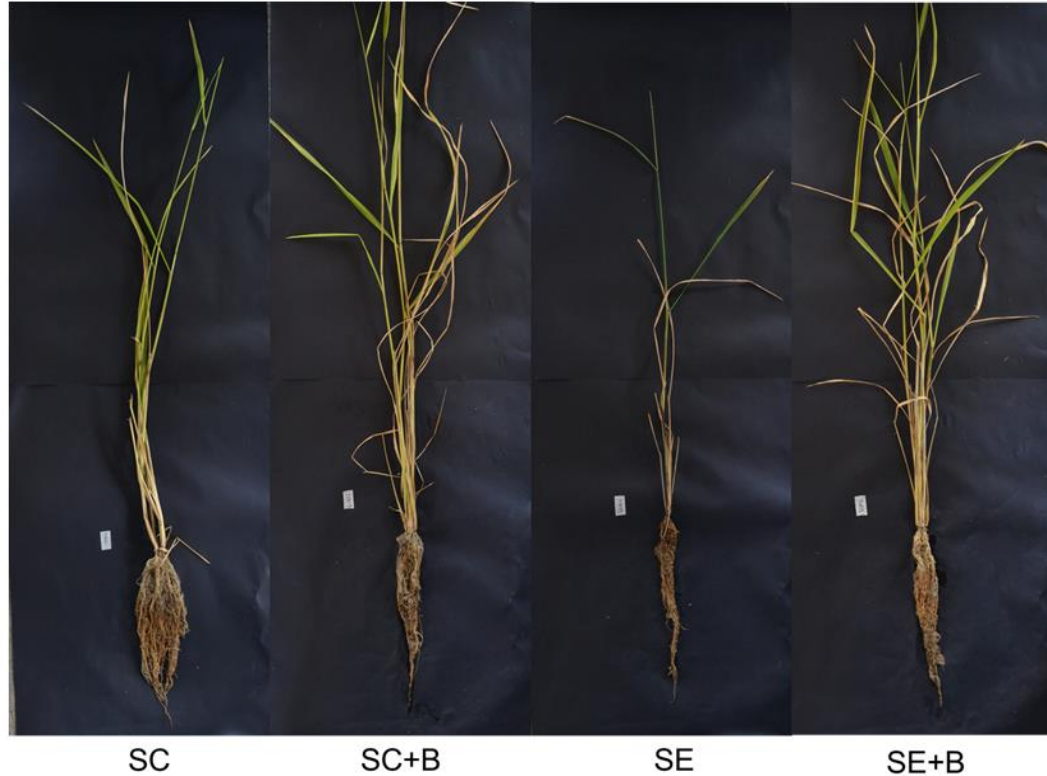


Figura 10. Diferencias observadas en el desarrollo del sistema radicular en respuesta a los distintos tratamientos al final del experimento (125 DDT).

Como se mencionó anteriormente, al final del experimento se evaluaron cuantitativamente diferentes parámetros de crecimiento (altura, número de tallos, número de panículas, número de hojas, y longitud de panículas) y de rendimiento (peso de granos, número de granos, % granos vanos).

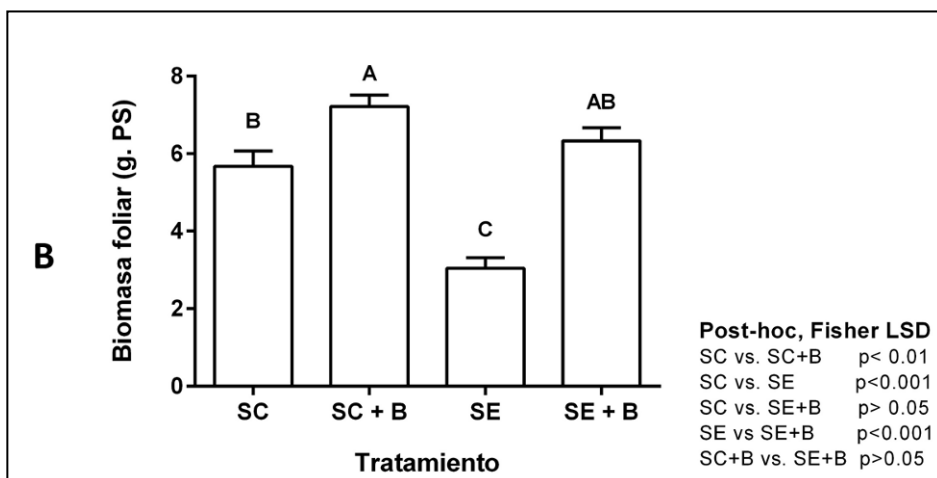
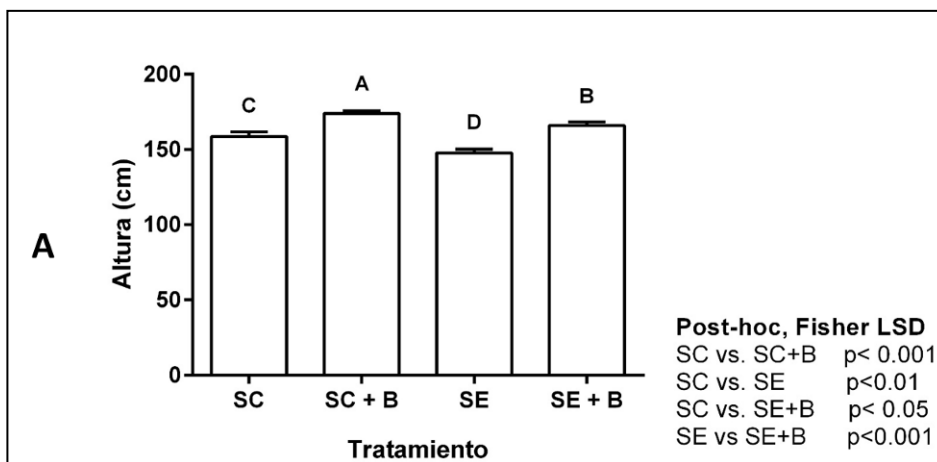
En relación a la altura, se observaron diferencias estadísticamente significativas entre los distintos tratamientos (Figura 11A). Las plantas cultivadas en SC alcanzaron un mayor porte en comparación con las plantas cultivadas en SE. La adición de biocarbón afectó positiva y significativamente este parámetro, tanto al aplicarse en SC como en SE. La altura presentada por las plantas cultivadas en SE+B fue mayor que las de SC.

Un patrón similar se observó para la producción de biomasa foliar y biomasa de tallos, aunque para este parámetro las diferencias entre los tratamientos SC y SE fue más marcada (Figura 11B-C), al igual que el impacto positivo de la adición del biocarbón. Es de resaltar que la adición de biocarbón a SE (SE+B) promovió la producción de biomasa aérea a niveles similares a los observados en SC y SC+B. Los patrones de acumulación de biomasa aérea observados se asociaron con diferencias en el número de tallos y número de hojas entre los distintos

tratamientos (Figura 11D-E). Se observó en el tratamiento SE+B se promovió el número de tallos y hojas con valores similares a los observados en SC+B.

Diferencias significativas también se observaron en relación a los parámetros asociados al rendimiento (Figura 12), particularmente en respuesta a la adición de biocarbón. Las plantas cultivadas en suelos enmendados con biocarbón mostraron un aumento significativo en el número y peso de las panículas (Figura 12A-B). La longitud de las panículas no varió en respuesta a los tratamientos, lo cual es un resultado esperado pues es un carácter muy estable en arroz (Figura 12C).

Un mayor rendimiento agronómico, medido como peso total de los granos y número de granos, se observó en las plantas cultivadas en presencia de biocarbón tanto sobre SC como sobre SE. Diferencias significativas también fueron observadas entre las plantas cultivadas en SC y SE (Figura 13A-B). En el porcentaje de granos llenos (Figura 14A), se observó diferencia significativa entre los tratamientos SC vs SE y una diferencia más marcada entres el tratamiento SE vs SE+B. Es importante resaltar que no se observaron diferencias estadísticamente significativas en el porcentaje de granos llenos (Figura 14B).



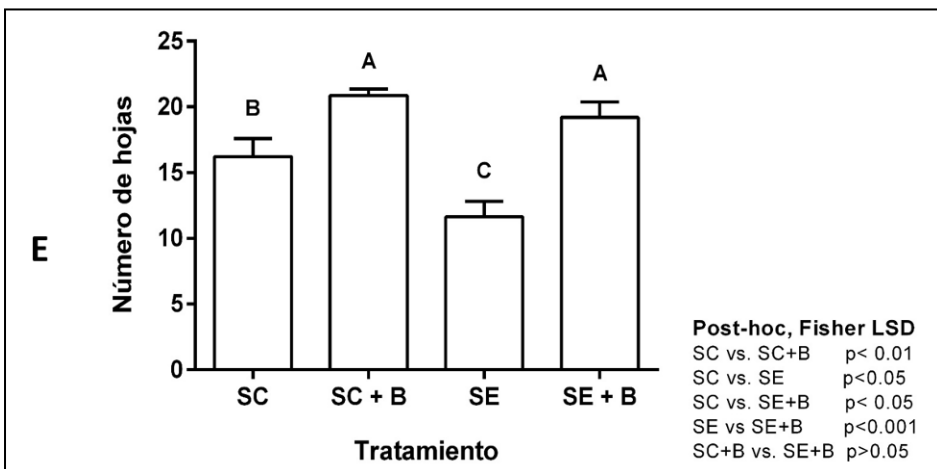
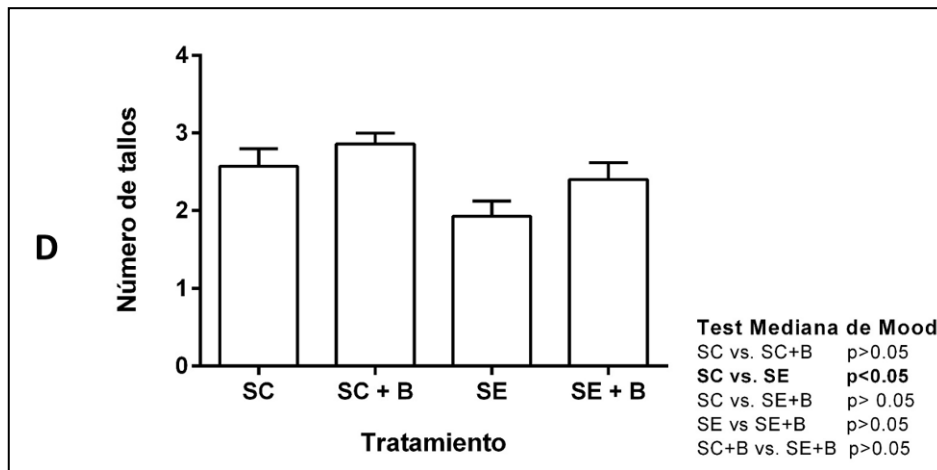
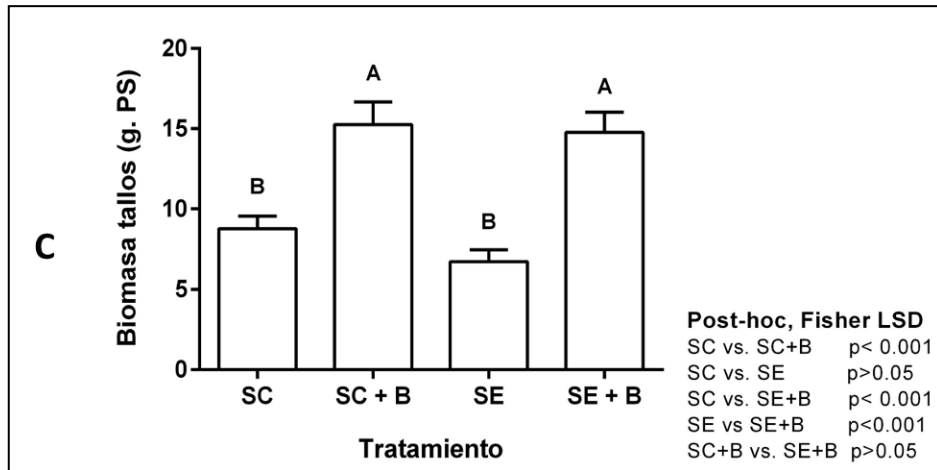


Figura 11. Respuesta de crecimiento las plantas de arroz a los distintos tratamientos. (A) Altura, (B) Biomasa foliar, (C) Biomasa de tallos, (D) Número de tallos y (E) Número de hojas. Las mediciones se realizaron al final del experimento (125 DDT).

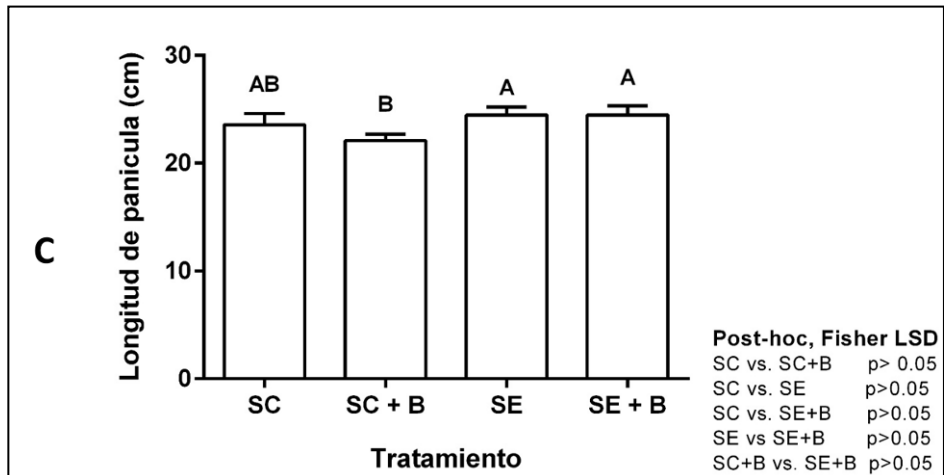
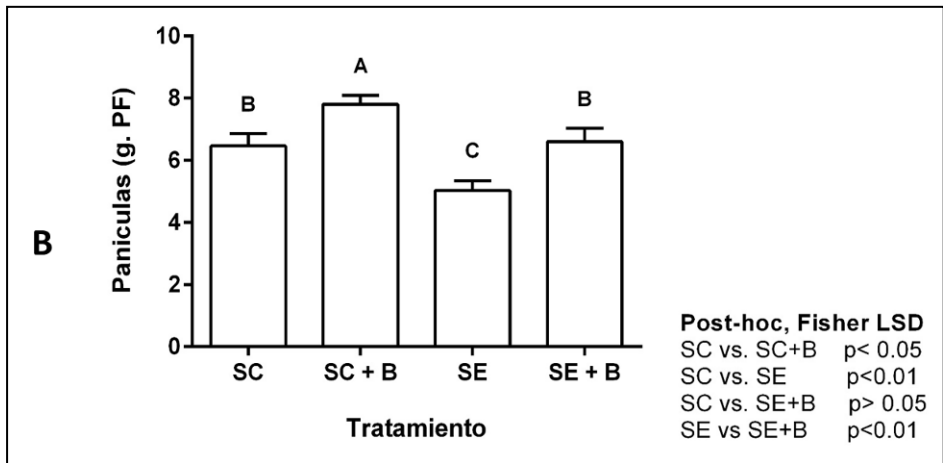
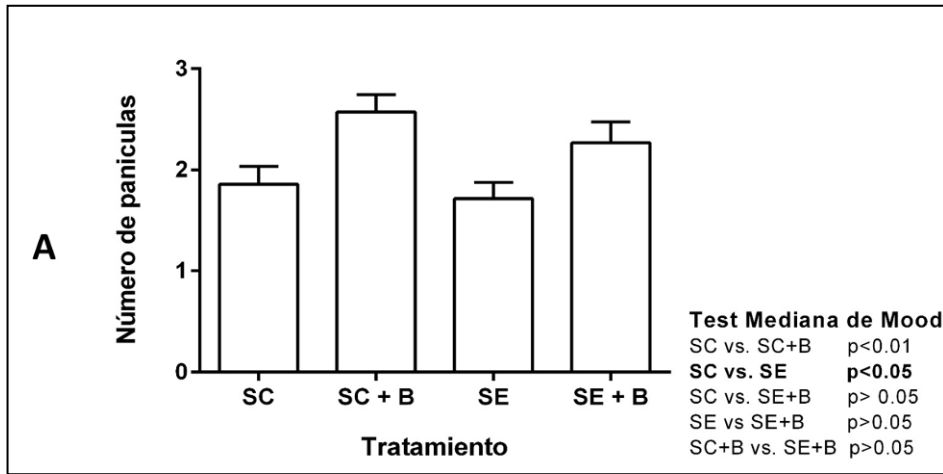


Figura 12. Respuesta de crecimiento las plantas de arroz a los distintos tratamientos. (A) Número de panículas, (B) Peso de panículas y (C) Longitud de panícula. Las mediciones se realizaron al final del experimento (125 DDT).

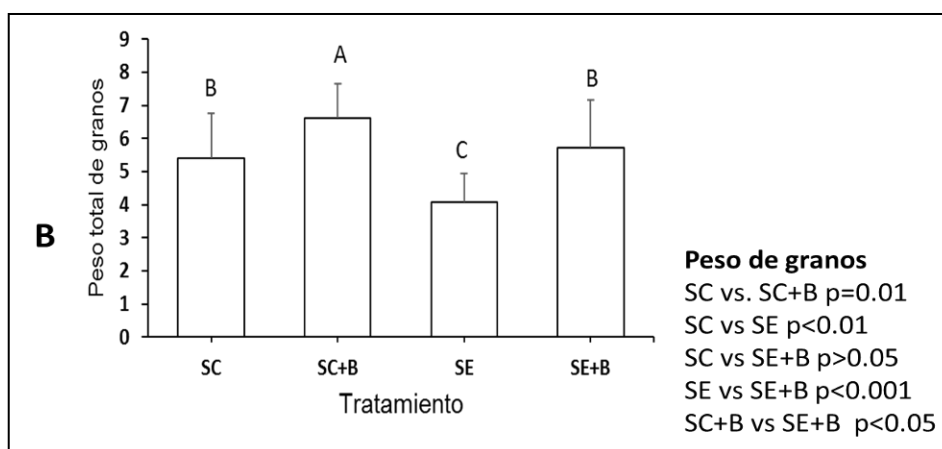
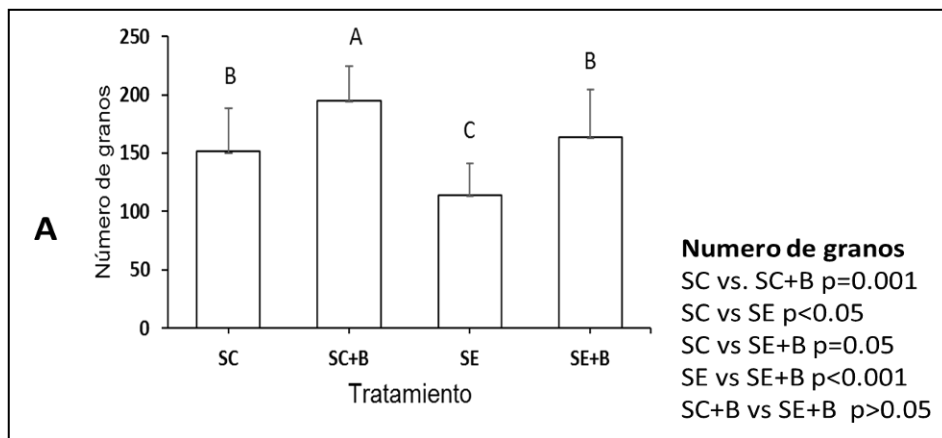
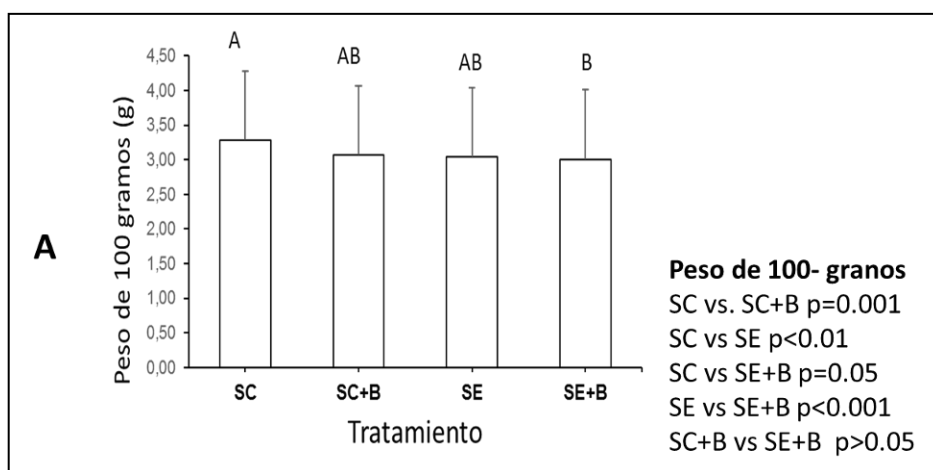


Figura 13. Respuesta de rendimiento de las plantas de arroz a los distintos tratamientos. (A) Número de granos y (B) Peso total de granos. Las mediciones se realizaron al final del experimento (125 DDT).



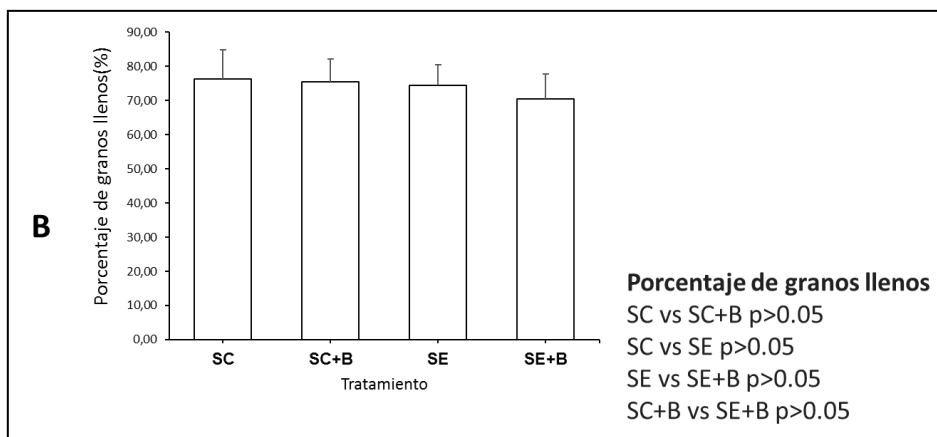


Figura 14. Respuesta del rendimiento de las plantas de arroz a los distintos tratamientos. (A) Peso de 100 granos y (B) Porcentaje de granos llenos. Las mediciones se realizaron al final del experimento (125 DDT).

2.5.4 Características fisicoquímicas del suelo y biocarbón

El análisis de las propiedades fisicoquímicas realizado para el suelo de cada uno de los tratamientos al inicio (día 0) y final (120 días) del experimento se muestra en la Tabla 7.

La aplicación de biocarbón generó un aumento inmediato en el contenido de elementos minerales disponibles para el crecimiento y el desarrollo de las plantas como lo son el fósforo disponible (P-Bray II), calcio (Ca), magnesio (Mg) y potasio (K). Es importante resaltar que el aluminio (Al) presentó una disminución al aplicar biocarbón, fenómeno que es relevante debido a que este elemento es tóxico en las plantas. El biocarbón aumentó el pH, lo cual pudo influir en el crecimiento de la planta directa o indirectamente mediante su efecto sobre la disponibilidad de nutrientes. Un aumento del pH también fue observado en los tratamientos SC y SE al final del experimento, posiblemente asociado al efecto de la planta (secreción de compuesto) o la actividad microbiana.

Tabla 7. Características fisicoquímicas del suelo de los distintos tratamientos determinadas al inicio (día 0) y final del experimento (120 DDT).

Tratamiento	pH	P-BrayII (mg/Kg)	MO (g/Kg)	Ca (Cmol/Kg)	Mg (Cmol/Kg)	K (Cmol/Kg)	Al (Cmol/Kg)	CICE (Cmol/ Kg)
Día 0								
SC	4,7	6,4	267,5	1,6	0,9	1,8	1,3	5,6
SC+B	5,1	30,6	220,5	2,3	1,8	3,5	0,4	8,0
SE	4,7	9,6	255,5	1,4	0,8	0,5	1,5	4,2
SE+B	5,0	26,4	231,5	1,5	1,1	1,7	0,9	5,2
Día 120								
SC	5,4	1,3	227,1	3,0	2,0	0,8	0,4	6,3
SC+B	5,2	2,2	255,5	1,6	0,7	0,3	0,9	3,6
SE	5,4	2,2	504,4	2,2	1,1	0,4	0,6	4,4
SE+B	5,5	1,9	244,6	1,8	1,0	0,33	0,7	3,9

2.5.5 Abundancia de bacterias mediante técnica de fluorescencia (DAPI)

El enriquecimiento bacteriano mediante centrifugación en gradiente de Nycodenz permitió obtener un anillo bacteriano definido (Figura 15).

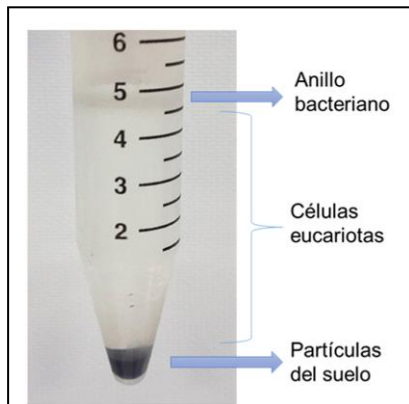


Figura 15. Anillo bacteriano obtenido por centrifugación diferencial con gradiente de Nycodenz.

Se usaron fotografías digitales de las muestras teñidas con DAPI para realizar el conteo del número de bacterias usando el programa ImageJ. En la Figura 16 Se observa una mayor diversidad de bacterias en los tratamientos que poseen biocarbón.

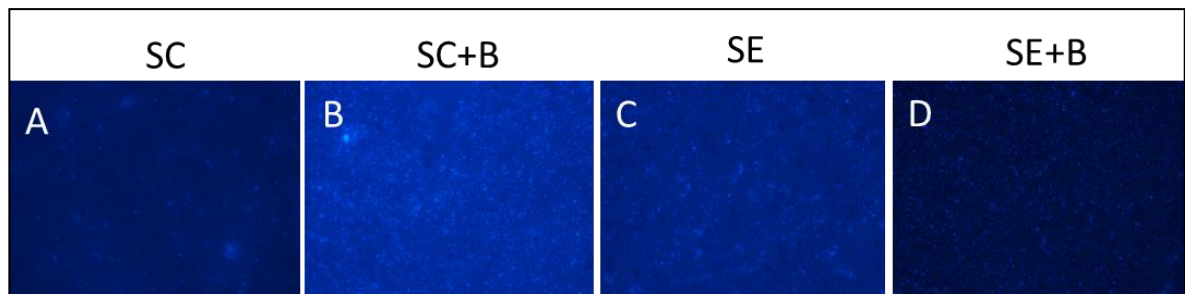


Figura 16. Fotografías de bacterias teñidas con DAPI, 120 DDT.

Tabla 8. Bacterias totales cuantificadas mediante tinción fluorescente con DAPI.

Días de incubación	Bacterias totales (células. g ⁻¹ suelo)			
	SC	SC+B	SE	SE+B
0	358,6 ± 228,5	66,6 ± 40,9	22,9 ± 2,17	57,1 ± 51,8
30	866,8 ± 195,8	399,8 ± 221,8	1085,1 ± 315,2	718,3 ± 710,2
60	2660,8 ± 62,0	677,2 ± 67,5	847,6 ± 298,2	1479,1 ± 1360,5
90	861,4 ± 443,1	917,9 ± 481,9	1223,4 ± 570,7	1678,8 ± 1053,9

Los resultados obtenidos muestran un aumento en la abundancia de las bacterias a través del tiempo de incubación del experimento (Tabla 8). Sin embargo, no se observó un efecto claro de la adición de biocarbón.

2.5.6 Extracción del ADN bacteriano

La extracción de ADN bacteriano se realizó a partir de 0,25 g de suelo como lo indica el fabricante del kit comercial "UltraClean Soil DNA Isolation". La electroforesis en gel de agarosa demostró la obtención de ADN de alta calidad (Figura 17).



Figura 17. ADN total extraído de distintas muestras de suelo antes de la amplificación V3 del gen 16S rARN . Carril 1-3; SC, 60 DDT. Carril 4-6; SC+B, 60 DDT. Carril 7-9; SC, 90 DDT. Carril 10-12; SC+B, 90 DDT.

2.5.7 Amplificación del gen 16S rARN mediante PCR

Se realizó una PCR anidada para amplificar el gen 16S rARN. A partir del ADN extraído mediante el kit se corrió una primera reacción de PCR utilizando los iniciadores 518F y 800R que generan un fragmento de 282 pb (Figura 18).

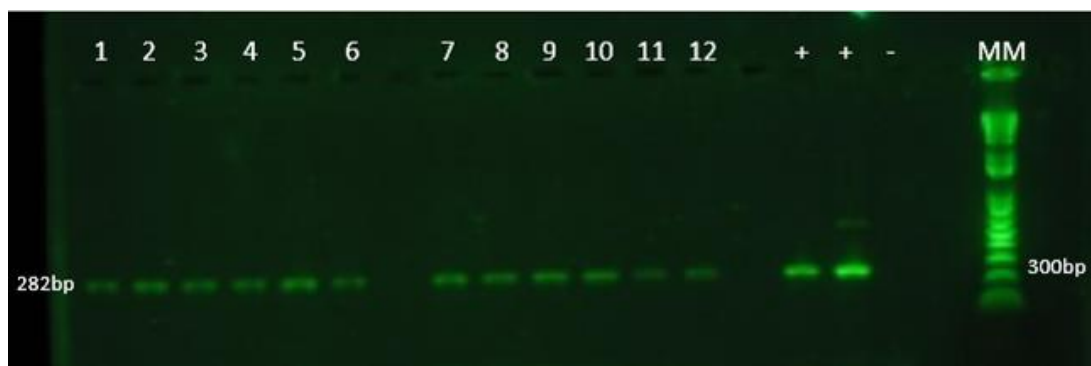


Figura 18. Amplificación del gen 16S con los iniciadores 518F y 800R. Carril 1-6 corresponden a tres réplicas del tratamiento SC y SC+B, 60 DDT, respectivamente. Los carriles 7-12 corresponden a tres réplicas del tratamiento DDT SC y SC+B, 90 DDT, respectivamente. (+) *E. coli* y *P. agglomerans*, respectivamente; (-) Control negativo de la reacción; (MM) Marcador molecular.

La segunda reacción de PCR se corrió a partir del producto de la primera PCR. Se usaron los iniciadores 518F con una cola de GC y 800R que generan un fragmento de 322 pb (Figura 19). La amplificación del fragmento fue exitosa en todas las muestras.

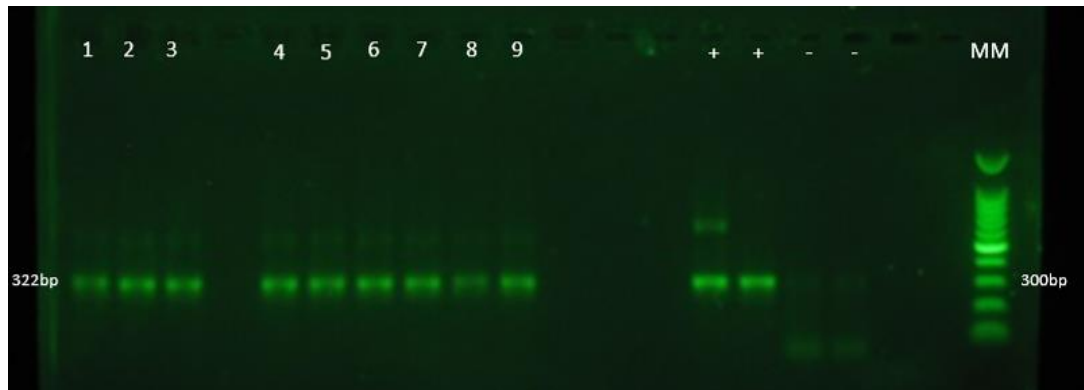


Figura 19. PCR anidada con los iniciadores 518F-GC y 800R. Los carriles 1, 2 y 3 corresponden a tres réplicas del tratamiento SC en el día 60. Los carriles 4, 5, 6, 7, 8 y 9 corresponden a tres réplicas del tratamiento SC y SC+B en el día 90, respectivamente. (+) *E. coli* y *P. agglomerans*, respectivamente; (-) Controles negativos de la reacción; MM) Marcador molecular.

2.5.8 Análisis de diversidad bacteriana mediante la técnica del DGGE

En este estudio, solo alcanzamos a realizar una corrida de DGGE para un pequeño grupo de muestras, debido a retrasos en la llegada de los reactivos necesarios para preparar los geles de acrilamida. Esperamos completar estos análisis una vez contemos con los reactivos.

La electroforesis en gradiente denaturante permite evaluar la diversidad bacteriana presente en el suelo pues detecta múltiples bandas, como puede observarse en las muestras correspondientes a este estudio (Figura 20).

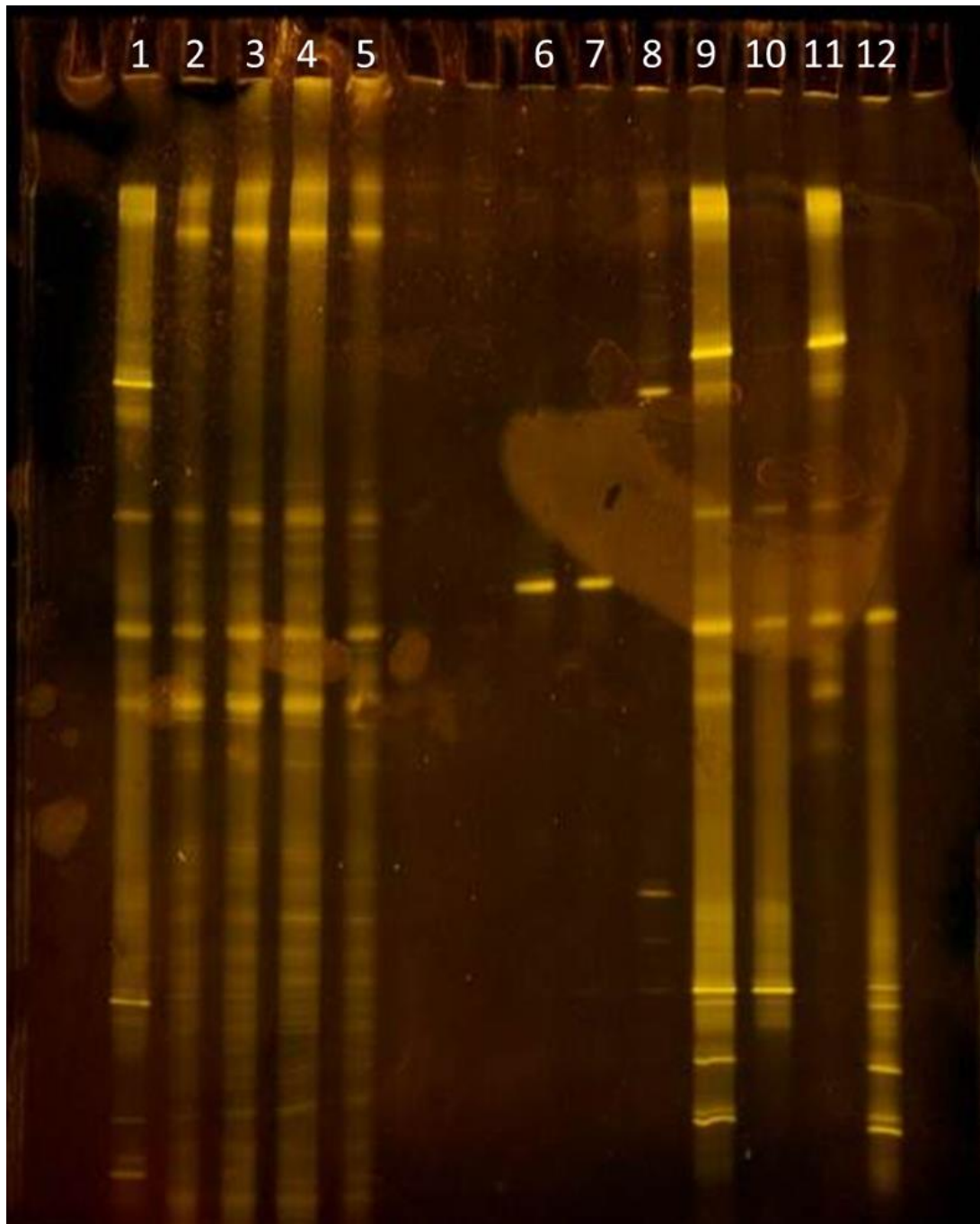


Figura 20. DGGE para algunas muestras. Carril 2-4; SC+B, 0 DDT. Carril 5, 9 y 10; SC, 0 DDT. Carril 11) *E.coli*, 12) *P. agglomerans* y 1) mezcla de controles. Carril 6-8; muestras que no conciernen al experimento.

2.6 Discusión

El biocarbón se ha propuesto como una enmienda orgánica de suelos degradados, ya que sus efectos afectan tanto a las propiedades fisicoquímicas del suelo como a la microbiota (Barrow, 2012). No obstante, debido a que el biocarbón tiene una residencia a escala milenaria en el suelo y sus cualidades varían de acuerdo a la materia biológica de la cual se derivan y al proceso de pirólisis, es necesario estudiar los distintos efectos y si estos persisten en el tiempo (Spokas, y otros, 2012).

Para conocer las diferentes propiedades del biocarbón sobre los diferentes procesos del suelo se han realizado experimentos a corto plazo para acercarse al conocimiento de la interacción planta-bacteria-biocarbón. En este trabajo se planteó como objetivo estudiar la interacción planta-bacteria-biocarbón y su efecto promotor sobre la productividad de especies de cultivo. Para alcanzar este objetivo, se midieron distintas variables fenotípicas de las plantas de arroz al final del experimento para conocer los efectos sobre la productividad al aplicar biocarbón derivado de cascarilla de arroz y para el análisis de las comunidades bacterianas se determinó la abundancia usando el conteo directo mediante la tinción con DAPI. De manera complementaria se analizaron las propiedades fisicoquímicas de suelo de los distintos tratamientos. Para observar solo los efectos del biocarbón sobre las propiedades fisicoquímicas se estableció un tratamiento con suelo estéril para eliminar los efectos asociados a las modificaciones que generan los microorganismos.

La aplicación de biocarbón promovió el crecimiento de las plantas, tanto a nivel de la biomasa aérea como del desarrollo radicular. Aumentos similares en la biomasa de la planta al aplicar biocarbón han sido reportados en otros estudios como es el caso de la investigación liderada por Petter y colaboradores (2012) que observaron aumento de la acumulación de biomasa de un cultivo de arroz al aplicarle biocarbón proveniente de *Eucalyptusm* usaron plantas de arroz y fueron cultivadas en campo.

La aplicación de biocarbón tanto a SC como SE promovió el aumento de diferentes componentes del crecimiento y productividad de la planta. En relación a la altura (altamente significativa), biomasa foliar, biomasa de tallos (altamente significativo), número de hojas, número de panículas y peso de panículas se ve un efecto positivo y significativo de la aplicación del biocarbón. Estos resultados coinciden con los encontrados en otras investigaciones donde la aplicación de biocarbón tuvo efectos importantes en el rendimiento y productividad de plantas de arroz (Asai, y otros, 2009; Petter, y otros, 2012), datos que podrían ser de interés para los agricultores y empresas del sector agrícola que busquen mejorar el rendimiento de sus cultivos y recuperar suelos degradados -disminuye la

deforestación en busca de tierras cultivadas-. Sin embargo, hay que tener en cuenta que la respuesta producidas por el biocarbón pueden variar dependiendo de la dosis, del tipo de suelo, de las condiciones climáticas de la zona del cultivo, de la materia prima de la cual deriva el biocarbón y de las condiciones de proceso de pirolisis (Spokas, y otros, 2012).

Las diferencias observadas en el crecimiento de las plantas entre los tratamientos SE y SC indican que la esterilización de los suelos ejerció un efecto negativo. La comparación de pH, contenido nutricional, contenido de MO y CICE indican que tal efecto no está relacionado con la alteración de las propiedades fisicoquímicas del suelo, sino con la ausencia de microorganismos. Es de resaltar que la adición de biocarbón a SE (SE+B) promovió el aumento del número de tallos, biomasa foliar, número de panículas y peso de panículas a niveles observados en SC y SC+B, lo cual indica que el biocarbón es un buen candidato para enmendar suelos con baja abundancia de microorganismos. Y la baja densidad de microorganismos en los suelos -puede ser consecuencia del abuso uso de fertilizantes químicos- se asocia con baja productividad de los cultivos, pero este efecto positivo que se observa del biocarbón sobre las plantas muestra el gran potencial de este para recuperar suelos degradados.

El efecto promotor del crecimiento inducido por el biocarbón podría estar asociado con una mayor disponibilidad de nutrientes pues los análisis fisicoquímicos demostraron un aumento de P y K, dos elementos que normalmente limitan el crecimiento y la productividad de este cultivo. El aumento en la concentración de estos elementos está directamente asociado a la adición de biocarbón, pues análisis previos de la composición química del biocarbón realizado en nuestro laboratorio, mostro un alto contenido de estos elementos (Anexo 1).

Los suelos tratados con biocarbón mostraron un aumento del pH, lo cual pudo favorecer el crecimiento directa e indirectamente a través de una mayor disponibilidad de nutrientes como Ca, K, Mg y P. Estudios previos realizados en el laboratorio de Fisiología Vegetal de la Universidad Icesi, han mostrado efectos similares de este biocarbón al aplicarse a otros suelos (Belalcázar, 2013). Adicionalmente, trabajos realizados como por ejemplo el estudio liderado por Rajkovich y colaboradores en 2011, mostraron un aumento en el contenido de P, K y otros elementos minerales en el suelo como el Mg al aplicar biocarbón al suelo (Rajkovich, y otros, 2011).

El pH es un parámetro muy importante porque además de ser determinante en la disponibilidad de los nutrientes también es una de las variables relevantes (valores entre 5 y 6) a la hora de describir las condiciones óptimas que favorecer el establecimiento de organismos del suelo junto con la humedad, temperatura (valores entre 15 y 35 °C) y cantidad de materia orgánica (FAO e IFA, 2002).

En este experimento se observó que la aplicación de biocarbón a suelo estéril promovió el aumento de la abundancia bacteriana. En los tratamientos SE y SE+B, la abundancia de bacterias aumentó a través del tiempo y a partir del día 60 se observó una mayor abundancia en SE+B. Lehmann y colaboradores también reportan al igual que los datos presentes en este estudio que al aplicar biocarbón que la biomasa microbiana aumentos (Lehmann, y otros, 2011). No obstante, es difícil atribuir el efecto del biocarbón exclusivamente al aumento de la abundancia de bacterias, pues, como se mencionó anteriormente, también se observó que éste afectó la disponibilidad de nutrientes y el pH del suelo. Por otro lado, un efecto positivo del biocarbón también fue observado en SC, y en este caso, no se observó un aumento de la abundancia de bacterias luego de aplicar biocarbón.

Un aspecto importante para establecer si el efecto del biocarbón está relacionado con la actividad bacteriana es evaluar cambios en la riqueza y diversidad de las comunidades de bacterias. Un objetivo de este estudio fue evaluar estos parámetros empleando la técnica de DGGE, la cual permite la separación de fragmentos de ADN con base en su secuencia (Muyzer, de Waal, & Uitterlinden, 1993). En este estudio usó la región V3 del gen 16S rARN ya que es la secuencia más usada para determinar diversidad bacteriana pues posee suficiente variabilidad. Sin embargo, no alcanzamos a obtener los resultados completos debido a retrasos en la entrega de reactivos.

En relación al uso de DGGE, es importante resaltar, que en este trabajo se estandarizó la metodología de extracción de ADN para el suelo de vivero que se utilizó en el experimento realizando unos lavados previos a las muestras de suelo según el protocolo de extracción de ADN de Whyte & Greer (2005). Esto se realizó con el de limpiar la muestra de sustancias que pudieran interferir con la extracción de ADN y posterior PCR, limitantes de la técnica de DGGE (Muyzer, y otros, 2004). También se logró estandarizar el método de enriquecimiento con Nycodenz para las muestras de suelo de vivero que se usó en este estudio, al realizar tres agitaciones iniciales con NaCl 0.9% y realizar tres centrifugaciones secuenciales de 1000, 2000 y 4500g de la muestra con Nycodenz, estas modificaciones se tomaron del protocolo de Poté, y colaboradores (2010) lo que permitió obtener un mejor anillo con distintas fracciones bacteriana.

De acuerdo a análisis anterior se observa que el efecto del biocarbón no solo se debe a un solo factor, sino que este influye sobre distintas propiedades del suelo que se relacionadas entre sí. Si se analiza la raíz de la planta puede absorber los nutrientes sólo en forma disuelta -es decir lo presente en la solución del suelo (FAO e IFA, 2002)- y como el biocarbón afecta la retención de humedad (Barrow, 2012) podría estar afectando esta disponibilidad de nutrientes. La humedad incrementada por la retención de agua junto con los microhábitas proporcionados por la porosidad del biocarbón proporcionan un ambiente que favorecer la proliferación de bacterias (Lehmann & Joseph, 2009), y las bacterias exhiben una

estrecha relación con las plantas y la presencia de estos microorganismos afectan el crecimiento y productividad de los cultivos al proporcionar nutrientes a las plantas (Tarkka, y otros, 2008). Además, el biocarbón tiene efectos sobre propiedades fisicoquímicas del suelo como el pH que determina a disponibilidad de nutrientes y valores determinados favorecen el establecimiento de bacterias. Todo esto proporciona un escenario en el que se ven involucradas propiedades del suelo, microbiota del suelo y características del biocarbón, interactuando entre si dilucidando una relación planta-bacteria-biocarbón.

El presente trabajo estableció diferencias cualitativas y cuantitativas de las plantas de arroz tratadas con biocarbón y sin biocarbón. Además, evidencio un aumento en la abundancia de bacterias al aplicar biocarbón al suelo. Y asevero el efecto encalador que exhibe el biocarbón en los suelos.

2.7 Potenciales beneficiarios

Este proyecto aportó información relevante sobre la relación planta-bacteria-biocarbón y su efecto promotor sobre la productividad de dos especies de cultivo, usando como indicadores medidas del crecimiento y productividad, y de abundancia de bacterias del suelo.

Los resultados de este proyecto generan información relevante tanto para empresas relacionadas con el sector agrícola que busquen estrategias que les permitan aumentar la productividad de sus cultivos y busquen recuperar suelos degradados que ya no pueden utilizar; y a futuras investigaciones sobre el biocarbón, tanto en la generación de nuevo conocimiento como a nivel aplicado.

2.8 Impacto ambiental

El uso de biocarbón es una estrategia que permite recuperar suelos degradados por la actividad agrícola y aumentar la productividad de cultivos, gracias a sus efectos sobre las propiedades fisicoquímicas del suelo y su microbiota. Además, su uso puede disminuir los fertilizantes químicos que causan gran contaminación y degradan los suelos.

En este proyecto se utilizaron reactivos tóxicos, que luego se desecharon de acuerdo a las reglas utilizadas para el tratamiento de residuos de la Universidad Icesi y lograr de esta manera reducir al máximo el riesgo de contaminar el ambiente.

2.9 Conclusiones

1. La adición de biocarbón derivado de cascarilla de arroz al suelo promovió el crecimiento y productividad de las plantas de arroz, afirmación basada en medidas de la altura; número de tallos, panículas, granos y hojas; y peso de tallos, hojas, panículas y granos.
2. La adición de biocarbón proveniente de cascarilla de arroz al suelo originó un aumento en la abundancia de bacterias según el conteo directo usando la técnica de tinción con DAPI.
3. Las características fisicoquímicas que se vieron favorecidas por la aplicación de biocarbón derivado de cascarilla de arroz al suelo fueron el fósforo disponible (P-Bray II), calcio (Ca), magnesio (Mg) y Potasio (K), y también se evidenció un aumento en el pH.
4. La porosidad del biocarbón junto con la retención de agua y nutrientes puede estar relacionada con el establecimiento de la microbiota que a su vez favorecen el crecimiento vegetal. Además, el biocarbón también tiene efectos sobre el pH que determina la disponibilidad de nutrientes y valores determinados favorecen el establecimiento de bacterias. Mostrando de esta manera un escenario donde el biocarbón afecta distintas propiedades del suelo, la microbiota y el crecimiento de las plantas que se ven relacionadas entre sí.

2.10 Recomendaciones

1. Para realizar el conteo de bacterias mediante la tinción con DAPI se recomienda modificar la metodología para obtener mejores imágenes, puesto que algunas zonas de las membranas que se humedecieron de manera accidental con aceite de inmersión -usado para la visualización en el objetivo 100X del microscopio- mostraron una mejor definición. Indicando que es posible obtener una mejor definición de la imagen y para ello se requiere modificar la metodología.
2. Se recomienda usar las modificaciones del uso de ImageJ aprovechando el uso de las herramientas que permiten binarizar la imagen y hacer un conteo automático, rápido y preciso, del número de bacterias teñidas con DAPI.
3. Para obtener mejores resultados en la extracción de ADN se recomienda usar los tres lavados iniciales con los distintos buffers para limpiar la muestra antes de usar el kit de extracción, indicados en la estandarización de la extracción.
4. Se recomienda la realización de tres agitaciones iniciales con NaCl 0.9% en el proceso del enriquecimiento con Nycodenz para obtener una mejor colección de la muestra como lo recomienda Poté, y otros.
5. Para conseguir un anillo con distintas fracciones bacterianas en el proceso de enriquecimiento con Nycodenz se recomienda realizar tres centrifugaciones 1000 g, 2000 g y 4500 g por 40 min a 4°C al centrifugar la muestra con Nycodenz como lo recomienda Poté, y otros.

2.11 Bibliografía

- Asai, H., Samson, B., Stephan, H., & Songyikhangsuthor, K. (2009). Biochar amendment techniques for upland rice production in Northern Laos: Soil physical properties, leaf SPAD and grain yield. *Field Crops Research*, 111, 81–84.
- Augustenborg, C., Hepp, S., Hagan, D., Schmidt, O., & Müller, C. (2012). Biochar and Earthworm Effects on Soil Nitrous Oxide and Carbon Dioxide Emissions. *Journal of Environmental Quality*, 1203-1209.
- Barrow, C. (2012). Biochar: Potential for countering land degradation and for improving agriculture. *ScienceDirect*, 21-28.
- Belalcázar, S. (2013). *Evaluación del biocarbón derivado de cascarilla de arroz como potenciador del establecimiento y proliferación de bacterias en suelos no perturbados*. Cali.
- Bolan, N., Kunhikrishnan, A., Choppala, R., & Chung, J. (2012). Stabilization of carbon in composts and biochars in relation to carbon sequestration and soil fertility. *ScienceDirect*, 264-270.
- Busch, D., Kammaann, C., Grünhage, L., & Müller, C. (2012). Simple Biototoxicity Tests for Evaluation of Carbonaceous Soil Additives: Establishment and Reproducibility. *Journal of Environmental Quality*, 1023-1032.
- C. Colin Hollister, J. (2012). Ammonium, Nitrate, and Phosphate Sorption to and Solute Leaching from Biochars Prepared from Corn Stover (*Zea mays* L.) and Oak Wood (*Quercus* spp.). *Journal of Environmental Quality*.
- Carvajal, J., & Mera, A. (2010). Biological fertilization: state of the art techniques for a sustainable agricultural development. *Producción más limpia*, 1-20.
- Downie, A., & Lukas Van, Z. (2013). Biochar: A Coproduct to Bioenergy from Slow-Pyrolysis Technology. En *Advanced Biofuels and Bioproducts* (pág. New York). New York: 91-117.
- Downie, A., & Van Zwieten, L. (2013). Biochar: A Coproduct to Bioenergy from Slow-Pyrolysis Technology. *Opportunities for Distributed Production and Soil Quality Enhancement*, 97-117.
- Duarte, S., Cássio, F., & Pascoal, C. (2012). Denaturing Gradient Gel Electrophoresis (DGGE) in Microbial Ecology –Insights from Freshwaters. *Centre of Molecular and Environmental Biology*, 173-196.
- Elad, Y., Cytryn, E., Meller, Y., Lew, B., & Graber, E. (2011). The Biochar Effect: plant resistance to biotic stresses. *Phytopathologia Mediterranea*, 335-349.
- Ellen, G., Yael, M., Max, K., Eddie, C., Avner, S., Dalia, D., . . . Yigal, E. (2010). Biochar impact on development and productivity of pepper and tomato grown in fertigated soilless media. *Plant Soil*, 481–496.
- Espinosa, J., & Molina, E. (1999). *Acidez y encalado de suelos*. International Plant Nutrition Institute.
- FAO e IFA. (2002). *Los fertilizante y su uso*. Roma.
- Fisher, D., & Glaser, B. (2012). Synergisms between Compost and Biochar for Sustainable Soil Amelioration. En S. Kumar, *Management of Organic Waste* (págs. 167-198).

- Glaser, B. (2007). Prehistorically modified soils of central Amazonia: A model for sustainable agriculture in the twenty-first century. *Philos*, 362:187–196.
- Godbout, S., Verma, M., Larouche, J., Potvin, L., Chapman, A., & Lemay, S. (2010). Methane production potential (B₀) of swine and cattle manures — a Canadian perspective. *Environ Technol*, 31:1371–9.
- Harrison, M. (1999). Molecular and cellular aspects of. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 50,361–189.
- Ikeda, S., Kaneko, T., Takashi Okubo, T., Rallos, L. E., Eda, S., Mitsui, H., . . . Minamisawa, K. (2009). Development of a Bacterial Cell Enrichment Method and its Application to the Community Analysis in Soybean Stems. *Microb Ecol*, 703–714.
- Jackson, C., Roden, E., & Churchill, P. (2000). Denaturing Gradient Gel Electrophoresis Can Fail to Separate 16S rDNA Fragments with Multiple Base Differences. *Molecular Biology*, 49-51.
- Jahiru, M., Rasul, M., Ahmed Chowdhury, A., & Ashwath, N. (2012). Biofuels Production through Biomass Pyrolysis. *energies*, 5, 4952-5001.
- Juan Sebastián, C., & Adriana Consuelo, M. (2010). Biological fertilization: state of the art techniques for a sustainable agricultural development. *Producción más limpia*, 1-20.
- Kepner, R., & Pratt, J. (1994). Use of fluorochromes for direct enumeration of total bacteria in environmental samples. *Microbiology and molecular biology reviews*, 603-615.
- Kerrison, P., & Steinke, M. (2010). DAPI staining protocol.
- Kloss, S., Zehetner, F., Dellantonio, A., Hamid, R., Ottner, F., & Liedtke, V. (2012). Characterization of Slow Pyrolysis Biochars: Effects of Feedstocks and Pyrolysis Temperature on Biochar Properties. *Journal of Environmental Quality*, 990-1000.
- Kochian, L. (1995). Cellular mechanisms of aluminum toxicity and resistance in plants. *Ann Rev Plant Physiol*, 46:237–260.
- Kookana, R. S. (2010). The role of biochar in modifying the environmental fate, bioavailability, and efficacy of pesticides in soils: a review. *Australian Journal of Soil Research*, 48, 627–637.
- Lehmann, J. (2007). Bio-energy in the Black. *Frontiers in Ecology and the Environment*, 381-387.
- Lehmann, J., & Joseph, S. (2009). Biochar for environmental management: science and technology. *Eartscan*.
- Lehmann, J., Rillig, M., Thies, J., Masiello, C., Hockaday, W., & Crowley, D. (2011). Biochar effects on soil biota – a review. *Soil Biology and Biochemistry*, 43,1812–1836.
- Liu, S. M. (2009). Soil Fertility enhancing microorganisms and their application as biofertilizers. *Nova Science Publishers, Inc*, 1-12.
- MARTIN, F. P., & COLLEEN, M. C. (1998). Bias in Template-to-Product Ratios in Multitemplate PCR. *APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY*, 3724-3730.

- Mühling, M., Woolven-Allen, J., Murrell, J. C., & Joint, I. (2008). Improved group-specific PCR primers for denaturing gradient gel electrophoresis analysis of the genetic diversity of complex microbial communities. *The ISME Journal*, 379–392.
- Muyzer, G., Brinkoff, T., Nübel, U., Santegoeds, C., Schäfer, H., & Wawer, C. (2004). Denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) in microbial ecology. *Molecular Microbial Ecology Manual*, 743-770.
- Muyzer, G., de Waal, E., & Uitterlinden, A. (1993). Profiling of complex microbialpopulations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rARN . *Applied and Environmental*, 695-700.
- Myers, R., Fischer, S., Lerman, L., & Maniatis, T. (1985). Nearly all single base substitutions in DNA fragments joined to a GC-clamp can be detected by denaturing gradient gel electrophoresis. *Nucleic Acids Res*, 3131-3145.
- Nikolcheva, L., Cockshutt, A., & Bärlocher, F. (2003). Determining diversity of freshwater fungi on decomposing leaves: comparison of traditional and molecular approaches. *Applied and Environmental Microbiology*, 2548-2554.
- Petter, F. A., Madari, B. E., Soler da Silva, M. A., Carbone Carneiro, M. A., Thaís de Melo Carvalho, M., Marimon Júnior, B. H., & Pacheco, L. P. (2012). Soil fertility and upland rice yield after biochar application in the Cerrado. *Pes. Agropec. Bras*, 699-706.
- Poté, J., Garcia, A., Mavingui, P., Ariztegui, D., & Wildi, W. (2010). Evaluation of quantitative recovery of bacterial cells and DNA from different lake sediments by Nycodenz density gradient centrifugation. *Ecological Indicators*, 234–240.
- Prendergast-Miller, M., Duvall, M., & Sohil, s. (s.f.). Biochar quantity in different soil zones: impacts on root foraging and soil nutrient content.
- Proyecto Life Sinergia. (5 de Nov de 2005). *Producción respetuosa en viticultura: Impacto ambiental en agricultura*. Obtenido de www.lifesinergia.org/formacion/curso/03_impactos_ambientales_en_agr.
- Rademaker, J., & de Bruijn, F. (2004). Computer-assisted analysis of molecular fingerprint profiles and database construction. *Molecular Microbial Ecology Manual*, 1397-1446.
- Rajkovich, S., Enders, A., Hanley, K., Hyland, C., Zimmerman, A., & Lehmann, J. (2011). Corn growth and nitrogen nutrition after additions of biochars with varying properties to a temperate soil. *Biochar and Soil Biota*, 48: 271–284.
- Rice Research Institute (IRRI). (2002). *Standard Evaluation System for Rice*. November.
- Sanderman, J., & J, B. (2010). Accounting for soil carbon sequestration in national inventories:a soil scientist's perspective. . *Environ Res Lett* , 5:034003.
- Sombroek, W. (1966). Amazon Soils. *Centre for Agricultural Publications and Documentation*.

- Spokas, K. A., Cantrell, K., Nova, J., Archer, D., Ippolito, J., . . . Nichols, K. (2012). Biochar: A synthesis of its agronomic impact beyond carbon sequestration. *J. Environ*, 41:973–989.
- Tarkka, M., Schrey, S., & Hampp, R. (2008). Plant Associated Soil Microorganisms. En *Molecular Mechanisms of Plant and Microbe Coexistence* (págs. 3-51). Springer-Verlag Berlin Heidelberg.
- Verheijen, F., Jeffery, S., Bastos, A., van der Velde, M., & Diafas, I. (2010). Biochar Application to Soils: A Critical Scientific Review of Effects on Soil Properties, Processes, and Functions. Luxembourg: Office for the Official Publications of the European Communities.
- Větrovský, T., & Baldrian, P. (2013). The Variability of the 16S rARN Gene in Bacterial Genomes and Its Consequences for Bacterial Community Analyses. *PLOS one*, 1-10.
- Warnock, D., Lehmann, J., Kuyper, T., & Rilling, M. (2007). Warnock, D. D., Lehmann, J., Kuyper, T. W., & Rilling, M. Mycorrhizal responses to biochar in soil: concepts and mechanisms. *Plant Soil*, 9-20.
- Watanabe, T., Asakawa, S., & Nakamura, A. (2004). DGGE method for analyzing 16S rDNA of methanogenic archaeal community in paddy field soil. *FEMS Microbiology Letters*, 153^163.
- Whyte, L. G., & Greer, C. W. (2005). Molecular Techniques for Monitoring and Assessing Soil Bioremediation. *Soil biology*, 204-205.
- Yu, W., Dodds, W., Banks, M., Skalsky, J., & Strauss, E. (1995). Optimal staining and sample storage time for direct microscopic enumeration of total and active bacteria in soil with two fluorescent dyes. *Applied and environmental Microbiology*, 3367-3372.

2.12 Anexos

Tabla 9. Características fisicoquímicas del biocarbón derivado de cascarilla de arroz

International BioChar Initiative (IBI) Nivel I				
	Húmedo	Seco		
Humedad	3.3	0		Porcentaje
Cenizas totales	69.7	72		Porcentaje
Cenizas no ácidas solubles	0.48	0.5		% de ceniza total
Cenizas ácidas solubles	96.2	99.5		% de ceniza total
Carbón orgánico	17	17.6		Porcentaje
Carbón inorgánico	0.31	0.32		Porcentaje
Hidrógeno/carbono	1.11	1.11		Tasa molar
Hidrógeno	1.6	1.6		Porcentaje
Nitrógeno total	0.41	0.43		Porcentaje
Oxígeno total	7.8	8		Porcentaje
pH	8.72	NA		Unidades
Abono con cal(valor neutro)	0.64	0.66		%CaCO3
Abono con cal (valor carbonato)	2.6	2.7		%CaCO4
Calcio (Ca)	0.053	0.055		Porcentaje
Magnesio (Mg)	0.019	0.019		Porcentaje
Actividad (Butano)	1.1	1.1		g/100g
Área superficial (correlación con butano)	168	169		m2/g
Densidad de masa	11.28	10.9		lb/cu ft
Azufre (S)	1.7	1.7		Porcentaje
Hierro (Fe)	0.035	0.036		Porcentaje
Manganeso (Mn)	0.019	0.019		Porcentaie

International BioChar Initiative (IBI) Nivel II				
	Húmedo	Seco	Máximo permitido	Unidades
Arsénico (As)	0.16	0.16	13	mg/Kg
Cadmio (Cd)	0.034	0.035	1.4	mg/Kg
Cobalto (Co)	0.34	0.35	93	mg/Kg

Cromo (Cr)	0.19	0.2	34	mg/Kg
Cobre (Cu)	6.3	6.6	143	mg/Kg
Plomo (Pb)	0.42	0.4	121	mg/Kg
Molibdeno (Mo)	0.01	0.01	5	mg/Kg
Mercurio (Hg)	0.01	0.01	1	mg/Kg
Níquel (Ni)	0.36	0.38	47	mg/Kg
Selenio (Se)	0.048	0.05	2	mg/Kg
Zinc (Zn)	6.8	7.1	416	mg/Kg
Boro (B)	3.9	4	Declaración	mg/Kg
Cloro (Cl)	491	508	Declaración	mg/Kg
Sodio (Na)	1327	1372	Declaración	mg/Kg
Propiedades básicas de mejora del suelo				
Potasio (K)	0.56	0.58	Declaración	Porcentaje
Fósforo (P)	0.2	0.2	Declaración	Porcentaje
Amonio (NH ₄ -N)	0.1	0.1	Declaración	mg/Kg
Nitrato (NO ₃ -N)	2.5	2.6	Declaración	mg/Kg
Fósforo (P) disponible	1387	1434	Declaración	mg/Kg
Conductividad eléctrica	0.75	NA	Declaración	dS/m
Humedad	3.3	0	Declaración	Porcentaje
pH	8.72	NA	Declaración	Unidades

(Belalcázar, 2013)