

ESCUELA POLITÉCNICA DEL EJÉRCITO

CARRERA DE INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA

EVALUACIÓN DEL POTENCIAL BIOFERTILIZANTE DE TRES  
CONSORCIOS DE CIANOBACTERIAS EN EL CRECIMIENTO Y  
VALOR NUTRICIONAL DE PASTO RYEGRASS ANUAL (*Lolium  
multiflorum*) A NIVEL DE CÁMARA DE INVERNADERO

Previa a la obtención de Grado Académico o Título de:

INGENIERA EN BIOTECNOLOGÍA

ELABORADO POR:

ROCÍO ELIZABETH FREIRE EGAS

SANGOLQUÍ, 12 de Junio de 2012

# **HOJA DE LEGALIZACIÓN DE FIRMAS**

**ELABORADO POR**

---

Rocío Elizabeth Freire

**DIRECTOR DE LA CARRERA**

---

Ingeniera Grace Tatiana Páez

**DELEGADO UNIDAD DE ADMISIÓN Y REGISTRO**

---

Ab. Carlos Orozco

Sangolquí, 12 de Junio de 2012

## CERTIFICACIÓN

Certifico que el trabajo titulado EVALUACIÓN DEL POTENCIAL BIOFERTILIZANTE DE TRES CONSORCIOS DE CIANOBACTERIAS EN EL CRECIMIENTO Y VALOR NUTRICIONAL DE PASTO RYEGRASS ANUAL (*Lolium multiflorum*) A NIVEL DE CÁMARA DE INVERNADERO, fue realizado en su totalidad por la Srta. ROCÍO ELIZABETH FREIRE EGAS como requerimiento parcial a la obtención del título de INGENIERA EN BIOTECNOLOGÍA.

Sangolquí, 12 de Junio de 2012

\_\_\_\_\_  
MC. Alma Koch

\_\_\_\_\_  
Ing. Pedro Romero

REVISADO POR:

\_\_\_\_\_  
Ab. Carlos Orozco

## DEDICATORIA

“He aprendido que el mundo quiere vivir en la cima de la montaña, sin saber que la verdadera felicidad está en la forma de subir la escarpada”

Gabriel García Márquez

Quiero dedicar mi tesis en primer lugar a mis padres, que con su esfuerzo constante supieron sacarnos adelante a mis hermanos y a mí, por los dignos ejemplos de lucha, superación y entrega, este trabajo es por ti mamá por haber sabido impulsarme con sabiduría en el largo recorrido de mi vida estudiantil, enseñándome que con constancia y empeño se derriba cualquier obstáculo y se logran alcanzar las metas.

También quiero dedicar esta tesis a mis queridos hermanos por su apoyo constante en los buenos y malos momentos, a Deivit por enriquecerme con sus experiencias profesionales y a mi Bebetina mi hermanita por su compañía, ocurrencias, muestras de afecto y por su confianza en mí, a ambos los amo y los llevo siempre en mi corazón.

Elizabeth Freire

## **AGRADECIMIENTO**

Agradezco principalmente a Dios por permitirme nacer, disfrutar de la vida, por haberme colocado en un hogar de bien y por darme una familia que ha fomentado en mí el deseo de superación y triunfo en la vida para poder enfrentar un futuro cada vez más competitivo.

A la MC. Alma Koch, quien desde que fue mi docente motivó mi formación académica y ahora como directora de tesis quiero agradecerle por todo su apoyo, confianza, guía y paciencia en esta investigación. A mi codirector Ing. Pedro Romero por su valioso tiempo prestado en el desarrollo de la tesis y por su asesoría en el análisis estadístico.

A la ESPE por abrirme sus puertas para formarme profesionalmente y por permitirme desarrollar mi investigación haciendo uso de sus instalaciones. Agradezco también a Multianalitica y a su analista Mauricio Meza por su colaboración en la parte final del proyecto.

A mi mejor amiga Cris por su amistad de tantos años y los diversos momentos compartidos dentro y fuera de aulas, y por su incondicional ayuda en cada una de las etapas de mi tesis, gracias amiga seguiremos adelante juntas.

A mis compañeros de tesis y amigas Elsita, Mary, Paty y en especial a Karlita por su colaboración, compañía y amistad. A mis compañeros del trabajo Fer, Luchito, Chris, Nathy, Raúl, Mafer por su apoyo. A mis amigos mecánicos por la ayuda prestada para equipar los nuevos laboratorios de investigación.

A todos quienes formaron parte directa o indirectamente de este proyecto, no bastarían las palabras para agradecerles la culminación de este sueño, espero no defraudarlos y seguir contando siempre con su valioso y sincero apoyo.

Elizabeth Freire

# ÍNDICE DE CONTENIDOS

HOJA DE LEGALIZACIÓN DE FIRMAS.....	ii
CERTIFICACIÓN.....	iii
DEDICATORIA.....	iv
LISTADO DE FIGURAS .....	ix
RESUMEN .....	xii
ABSTRACT .....	xiii
CAPÍTULO 1: INTRODUCCIÓN .....	1
1.1 Formulación del problema.....	1
1.2 Justificación del Problema.....	3
1.3 Objetivos de la investigación .....	5
1.3.1 Objetivo general.....	5
1.3.2 Objetivos específicos .....	5
1.4 Marco Teórico .....	6
1.4.1 Biofertilizantes.....	6
1.4.2 Cianobacterias .....	7
1.4.2.1 Características de las Cianobacterias .....	8
1.4.3 Fijación Biológica de Nitrógeno por Cianobacterias.....	10
1.4.3.1 Mecanismo de fijación biológica de nitrógeno .....	12
1.4.3.2 Estrategias de protección de la nitrogenasa frente al oxígeno.....	13
1.4.4 Uso de las Cianobacterias como biofertilizante.....	14
1.4.5 Generalidades del Raygrass anual ( <i>Lolium multiflorum</i> ) .....	15
1.4.6 Características morfoagronómicas del Raygrass .....	16
1.4.7. Calidad del pasto .....	16
1.4.7.1 Contenido de humedad .....	17
1.4.7.2 Materia seca.....	17
1.4.7.3 Proteína bruta.....	18

1.4.7.4 Fibra bruta .....	18
1.4.7.5 Grasas.....	19
1.4.7.6 Ceniza .....	19
1.5 Sistema de hipótesis .....	20
1.5.1 Hipótesis nula .....	20
1.5.2 Hipótesis alternativa.....	20
CAPÍTULO 2: MATERIALES Y MÉTODOS.....	21
2.3 Periodo de investigación .....	21
2.4 Diseño .....	22
2.5 Procedimiento .....	23
2.5.1 Recolección de muestras.....	23
2.5.2 Obtención de consorcios microbianos con cianobacterias.....	24
2.5.3 Masificación y mantenimiento de los consorcios microbianos con cianobacterias.....	25
2.5.4.1 Cinética de crecimiento .....	26
2.5.4.2 Recuento celular.....	26
2.5.5 Elaboración de los biofertilizantes.....	27
2.5.4.1 Preparado de estiércol vacuno .....	27
2.5.4.2 Preparado de gallinaza.....	28
2.5.5 Preparación del fertilizante químico .....	29
2.5.6 Preparación y esterilización de semillas y sustrato .....	29
2.5.6.1 Preparación del sustrato.....	29
2.5.6.2 Desinfección y siembra de las semillas .....	30
2.5.6 Aplicación de los tratamientos fertilizantes.....	31
2.5.7 Análisis de variables morfo agronómicas del Raygrass .....	32
2.5.7.1 Altura de la planta de Raygrass.....	32
2.5.7.2 Cobertura .....	33
2.5.7.3 Medición de longitud de la raíz principal.....	34
2.5.8 Supervivencia de consorcios microbianos .....	34

2.5.9	Análisis bromatológico del Raygrass .....	35
2.5.9.1	Determinación de humedad.....	35
2.5.9.2	Determinación de Proteína .....	36
2.5.9.3	Determinación de grasa.....	38
2.5.9.4	Determinación de la fibra bruta.....	40
2.5.9.5	Determinación de cenizas .....	41
2.6	Análisis de datos .....	43
2.6.1	Variables morfoagronómicas .....	43
2.6.2	Sobrevivencia de consorcios de cianobacterias.....	43
2.6.3	Análisis de las variables morfoagronómicas .....	43
CAPÍTULO 3: RESULTADOS .....		44
3.1	Conorcios microbianos con cianobacterias .....	44
3.2	Análisis de variables morfoagronómicas del Raygrass .....	45
3.2.2	Porcentaje de cobertura del Raygrass en las masetas .....	48
3.2.3	Longitud de la raíz principal de las plantas de Raygrass .....	50
3.4	Análisis de variables nutricionales.....	53
3.4.2	Porcentaje de humedad del Raygrass .....	54
3.4.3	Porcentaje de proteína del Raygrass .....	55
3.4.4	Porcentaje de grasa del Raygrass .....	57
3.4.5	Porcentaje de fibra del Raygrass .....	58
3.4.6	Porcentaje de ceniza del Raygrass.....	59
CAPÍTULO 4: DISCUSIÓN.....		62
4.1	Análisis de la influencia de los biofertilizantes en las variables morfoagronómicas evaluadas del Raygrass .....	62
4.2	Análisis de la sobrevivencia de consorcios microbianos con cianobacterias.....	65
4.3	Análisis de variables nutricionales del Raygrass .....	66
CAPÍTULO 5: CONCLUSIONES .....		72
CAPÍTULO 6: RECOMENDACIONES.....		73
CAPÍTULO 7: BIBLIOGRAFÍA.....		74



## LISTADO DE TABLAS

Tabla 1.1 Clasificación y tipos morfológicos de las Cianobacterias .....	10
Tabla 1.2 Género de Cianobacterias implicadas en la fijación de nitrógeno .....	11
Tabla 1.3 Clasificación taxonómica del Raygrass .....	15
Tabla 2.1 Tratamientos aplicados a semillas de Raygrass .....	23
Tabla 2.2 Escala de cobertura de Pastos.....	34
Tabla 3.1 Análisis de varianza para la variable altura .....	46
Tabla 3.2 Prueba LSD de Fisher para la variable altura.....	46
Tabla 3.3 Altura de la planta de Raygrass en cuatro observaciones.....	47
Tabla 3.4 Análisis de varianza para la variable cobertura .....	48
Tabla 3.5 Prueba LSD Fisher para la variable cobertura .....	48
Tabla 3.6 Porcentaje de cobertura del Raygrass en masetas .....	49
Tabla 3.7 Análisis de varianza para la variable longitud de raíz.....	50
Tabla 3.8 Prueba LSD Fisher para la variable longitud de raíz .....	51
Tabla 3.9 Análisis de varianza para la variable materia seca.....	54
Tabla 3.10 Prueba LSD Fisher para la variable materia seca .....	54
Tabla 3.11 Análisis de varianza para la variable humedad .....	55
Tabla 3.12 Prueba LSD Fisher para la variable humedad.....	55
Tabla 3.13 Análisis de varianza para la variable proteína .....	56
Tabla 3.14 Prueba LSD Fisher para la variable proteína .....	56
Tabla 3.15 Análisis de varianza para la variable grasa .....	57
Tabla 3.16 Prueba LSD Fisher para la variable grasa.....	57
Tabla 3.17 Análisis de varianza para la variable fibra .....	58
Tabla 3.18 Prueba LSD Fisher para la variable fibra.....	58
Tabla 3.19 Análisis de varianza para la variable ceniza .....	59
Tabla 3.20 Prueba LSD Fisher para la variable ceniza .....	59
Tabla 3.21 Porcentajes nutricionales del Raygrass.....	60

## LISTADO DE FIGURAS

Figura 1.1 Cianobacterias con heterocistos .....	9
Figura 2.1 Siembra directa de muestras en medio BG-110 sólido. ....	24
Figura 2.2 Mantenimiento de consorcios de cianobacterias). ....	26
Figura 2.3 Preparación de biofertilizante vacuno. ....	27
Figura 2.4 Preparación de Gallinaza .....	28
Figura 2.5 Proceso de reparación del sustrato.....	30
Figura 2.6 Desinfección de semillas.....	31
Figura 2.7 A) Volumen de los consorcios a inocular B) Aplicación de consorcios de cianobacterias al sustrato C) Masetas con Raygrass y tratamientos en cámara de invernadero .....	32
Figura 2.8 Seguimiento de la altura del Raygrass.....	33
Figura 2.9 Observación visual del porcentaje de cobertura de la maseta con el Raygrass.....	33
Figura 2.10 Medición de la longitud de la raíz .....	34
Figura 2.11 Siembra de muestras para comprobación de sobrevivencia de consorcios de cianobacterias. ....	35
Figura 2.12 A) Pesado de las muestras en las cápsulas B) Cápsulas de aluminio con muestras de Raygrass secadas en la estufa (Freire, 2012). ....	36
Figura 2.13 Proceso de digestión de muestras de Raygrass .....	37
Figura 2.14 A) Preparación del equipo de destilación de proteína .....	37
Figura 2.15 Proceso de Hidrólisis del Raygrass.....	38
Figura 2.16 Proceso de filtración en la determinación de grasas .....	39
Figura 2.17 Extractor de grasa Soxhlet con las muestras de Raygrass .....	40
Figura 2.18 Hidrólisis básica de muestras.....	41
Figura 2.19 A) Cápsulas con muestras de Raygrass en la estufa B) cápsulas en el desecador.....	42
Figura 2.20 A) Quemado de las muestras B) Muestras ingresadas en la mufla....	42

Figura 3.1 Crecimiento de consorcios de cianobacterias a partir de muestras recolectadas en campo .....	44
Figura 3.2 Consorcios microbianos con cianobacterias observados al microscopio con aumento de 100X .....	45
Figura 3.3 Variabilidad del promedio de la altura de las plantas de Raygrass .....	47
Figura 3.4 Variabilidad del promedio del índice de cobertura de Raygrass en macetas.....	49
Figura 3.5 Variabilidad del promedio de la longitud de la raíz de la planta de Raygrass .....	52
Figura 3.6 Evaluación de la sobrevivencia de consorcios de cianobacterias tanto en sustratos como en hojas.....	53
Figura 3.7 Variabilidad de los porcentajes nutricionales del Raygrass.....	61

## RESUMEN

Se evaluó el potencial biofertilizante de tres consorcios de cianobacterias en el crecimiento y valor nutricional del pasto Raygrass anual. Este trabajo se realizó por la necesidad de contar con un tratamiento biológico alternativo al uso de fertilizantes químicos.

Se obtuvieron tres consorcios microbianos con cianobacterias (CMA, CMB y CMC) a partir de muestras de tapetes bacterianos recolectados en el Pasochoa. Se masificó y se mantuvo los consorcios microbianos en medio BG110, se siguió su crecimiento mediante espectrofotometría y recuento en cámara de Neubauer.

Como tratamientos adicionales se prepararon dos biofertilizantes, uno a base de estiércol vacuno y otro de gallinaza. También se empleó un fertilizante químico y un blanco (agua destilada) como control. La cantidad del consorcio de cianobacterias a ser usado, se determinó por ensayos previos. Se aplicó 40 mL de los consorcios a las plántulas de Raygrass sembradas en maceta. La capacidad fertilizante de los tratamientos fue evaluada mediante el análisis de altura de la planta, longitud de la raíz y cobertura en maceta. Posterior a la cosecha de las plantas se analizó la influencia de los tratamientos respecto a las variables nutricionales: materia seca, humedad, proteína, fibra y ceniza.

Como resultados, se obtuvo que las muestras de Raygrass tratadas con CMA y CMB, mostraron mejores alturas con 23.16 cm y 21.18 cm respectivamente. En cuanto a la cobertura, las plantas tratadas con CMB cubrieron en un 83.8% a la maceta. La longitud de la raíz también se vio favorecida con el uso de CMB, alcanzando un valor de 4.68 cm. Respecto a la cuantificación de variables morfoagronómicas, se encontró que CMA influyó de forma positiva en la síntesis de proteína y grasa del Raygrass, obteniéndose valores de 11.74% y 0,26% respectivamente. Las plantas tratadas con CM<sub>C</sub> mostraron humedad del 78, 26% y contenido de fibra del 4.08%.

## ABSTRACT

The bio-fertilizing potential of three consortia of cyanobacteria on the annual growth and nutritional value of Ryegrass was evaluated. This work was performed based on the need for biological treatment as alternative to chemical fertilizers.

Three microbial consortia with cyanobacteria ( $CM_A$ ,  $CM_B$  and  $CM_C$ ) were obtained from samples collected from the bacterial mats in Pasochoa. The microbial consortia were massively multiplied and kept in BG110, the growth was monitored by using spectrophotometry and counting in a Neubauer Chamber.

In addition, two biofertilizers were prepared, one based on cow dung and another on manure. Moreover, a chemical fertilizer and a blank (distilled water) were used as a control. The amount of the consortium of cyanobacteria to be used was determined by preliminary tests. 40 mL of the consortia were applied to the Ryegrass seedlings planted in a pot. The fertilizing capacity of the treatments was assessed through an analysis of plant height, root length and coverage in the pot. After harvesting the plants the influence of the treatments regarding the nutritional variables were examined: dry matter, moisture, protein, fiber and ash.

As a result, it was found that Ryegrass samples treated with  $CM_A$  and  $CM_B$ , showed better heights with 23.16 cm and 21.18 cm, respectively. In terms of coverage, the plants treated with  $CM_B$  covered the pot by 83.8%. The root length was also improved by the use of  $CM_B$ , reaching a length of 4.68 cm. Regarding the quantification of morph agronomic variables found that  $CM_A$  positively influences the synthesis of protein and fat of the Ryegrass, yielding values of 11.74% and 0.26% respectively.  $CM_C$ -treated plants showed 78% humidity, 26% and a fiber content of 4.08%.

# **CAPÍTULO 1: INTRODUCCIÓN**

## **1.1 Formulación del problema**

En el Ecuador, el incremento en el uso de fertilizantes en la agricultura constituye un grave problema de contaminación ambiental y daño a la salud de la población expuesta a este tipo de componentes químicos (Orozco & Soria, 2008). En el intento por mejorar la producción y el rendimiento de los cultivos, los agricultores emplean fertilizantes de forma desmesurada, ocasionando serios perjuicios al suelo, la atmósfera y el agua que consumimos (Blanco, 1999).

Entre los principales problemas que acarrea el uso de fertilizantes, está la contaminación de los acuíferos subterráneos, debido a la lixiviación de los nitratos (principales componentes de los fertilizantes) hacia el subsuelo (García & Dorronso, 1999). Se generan grandes problemas de salud si se llega a consumir agua contaminada con nitratos, debido a su transformación en nitritos por participación de bacterias existentes en el estómago y vejiga urinaria. A su vez, los nitritos se transforman en ciertos compuestos cancerígenos, conocidos como Nitrosaminas, causando fuertes afecciones al estómago (Suquilanda, 2003).

Entre otros daños ambientales provocados por el empleo inconsciente de fertilizantes, está el desbalance natural que se genera en el ecosistema. Producto del desequilibrio entre la estructura físico química y orgánica del suelo, la diversidad microbiana se reduce y los nutrientes naturales propios de los suelos escasean (Blanco, 1999). En un ambiente infértil se hace difícil producir nuevos cultivos, ya que las plantas se vuelven más vulnerables a enfermedades y como consecuencia la producción agrícola disminuye en cantidad y calidad (Sánchez & Mass, 2009).

Para intentar paliar los efectos de este tipo de sistemas agrarios en el Ecuador, se han establecido herramientas que minimicen el impacto negativo de los fertilizantes químicos. Es así, que entidades públicas como el MAGAP están capacitando a los agricultores para que realicen análisis de suelos previos a la fertilización, conozcan la composición de los fertilizantes, la dosis necesaria dependiendo del cultivo así como la forma de aplicación. Al adoptar estos conocimientos se aprovecha de mejor manera los compuestos de los fertilizantes, sin embargo, no se erradica el problema de contaminación (Méndez, 2005). Es por esto que se requiere de una alternativa biológica que resulte amigable con el ambiente, la salud y que a su vez favorezca los procesos de producción.

En la última edición de la guía de bolsillo “Los fertilizantes y su uso”, emitido por la FAO, se hace énfasis en la combinación de abonos orgánicos con fertilizantes minerales, y se da a conocer sobre los beneficios del uso de los biofertilizantes. Según Delgado *et al.*, (2003), las alternativas prácticas de fertilización no procedentes de la industria química datan del siglo XVII, de las cuales se destaca la producción de biofertilizantes. En la actualidad se ha retornado a esta práctica como una opción para producir cultivos sanos y económicos. Hoy en día las investigaciones están centradas en desarrollar nuevas alternativas biológicas que representen opciones más viables de producción para el sector agrícola y garanticen la protección ambiental.

Un tratamiento que está siendo adoptado a nivel industrial en países desarrollados es la producción de microorganismos propios del suelo como biofertilizantes (Rondan, 2001). Entre los microorganismos capaces de realizar el proceso de fijación biológica de nitrógeno atmosférico, están cierto tipo de cianobacterias (Rondan, 2001). Los consorcios microbianos con cianobacterias son cada vez más importantes en el área agrícola, debido a su capacidad de fijar nitrógeno, potenciar la

producción de metabolitos secundarios y promover la captación de nutrientes en las plantas (Abed & Golubic, 2009).

Las cianobacterias son microorganismos fotosintéticos, conocidos comúnmente como algas verde azules que colonizan numerosos ecosistemas desde acuáticos a terrestres (Diestra *et al.*, 2004). Son microorganismos de gran importancia en la agricultura ecológica, ya que impulsan la conservación ambiental al aportar con nutrientes, vitaminas y hormonas (Bejarano & Restrepo, 2002). Con el uso de estos biofertilizantes las texturas de los suelos también mejoran, y con ello se promueve la germinación y desarrollo de las plantas (Infantes & Vásquez, 1999; Rondan, 2001).

## **1.2 Justificación del Problema**

En la actualidad, la creciente producción agraria en el país ha conllevado al uso de fertilizantes que cubran los requerimientos nutricionales de los cultivos y, ante ello, los pastos no han sido la excepción (Benítez, 2005). Considerando la importancia que tienen los pastos en la alimentación del ganado, cada vez es más frecuente el uso de fertilizantes que garanticen forrajes con calidad morfoagronómica (Belmar *et al.*, 2008).

Debido a la necesidad de aumentar el rendimiento de las pasturas, los agricultores recurren a los fertilizantes para suplir las necesidades de nitrógeno que demandan dichas plantas (Moller & Reents, 2007). Convencionalmente se ha utilizado fuentes de nitrógeno químico como la urea, nitrato de amonio y sulfato de amonio, sin embargo, el uso continuo inadecuado y exclusivo de estos fertilizantes inorgánicos se vuelve más nocivo que beneficioso (INIAP, 2007). Desde esta perspectiva, se exige buscar alternativas que promuevan el crecimiento de pastos, garantizando protección ambiental y salud poblacional (Aruquipa, 2007).



Una alternativa para contrarrestar el uso de fertilizantes químicos es la implementación de fertilizantes orgánicos o biofertilizantes. El impulsar la utilización de biofertilizantes en el cultivo de pastos, representa un gran interés científico y tecnológico para obtener rendimientos satisfactorios en favor de los agricultores (Alcíbar, 2000). La producción orgánica es una opción que beneficia tanto a productores como consumidores, sin embargo, lo que realmente justifica la presente investigación, es el hecho de que los biofertilizantes reducen considerablemente la contaminación del suelo, del agua y del aire (Suquilanda, 2001). Respecto a los productores, ellos se benefician al evitar el riesgo de contraer problemas en las vías respiratorias, alergias en la piel, esterilidad, mutaciones en su descendencia, entre otros impactos negativos que conlleva la manipulación de fertilizantes tradicionales (Moreira & Domínguez, 2005).

En los últimos años, la preocupación por la conservación ambiental se ha enfocado en buscar tecnologías fiables y sostenibles, es así, que se ha impulsado la investigación en el desarrollo de los biofertilizantes. Entre los biofertilizantes están: estiércoles animales, restos vegetales de alimentos, preparados a base de microorganismos o cualquier otra fuente orgánica y natural. La importancia de este tipo de abonos orgánicos obedece a que son fuente de vida bacteriana para el suelo y para la nutrición de las plantas (Anesín *et al.*, 2003). Sin embargo, se requiere aplicar grandes cantidades de estos biofertilizante para cubrir todos los requerimientos nutricionales de los cultivos (Merchán *et al.*, 2008). Es por ello que se requiere de nuevas alternativas, específicamente microbiológicas, que promuevan la fijación biológica de nitrógeno y otros nutrientes y que resulten efectivas, reproducibles y rentables (Iglesias & Montero, 2005).

En consideración de lo mencionado, países con un mayor desarrollo biotecnológico, han centrado sus esfuerzos en investigar los beneficios de

los microorganismos dentro de la agricultura. Es así, que en países asiáticos, hace algunos años atrás, se ha venido fertilizando los suelos empleando microorganismos fotosintéticos que han demostrado tener la propiedad de fijar nitrógeno atmosférico (Blanco *et al.*, 1999; Torres & Ariño, 2001). Este tipo de microorganismos conocidos como cianobacterias o algas verde azules, específicamente los de naturaleza filamentosa, son capaces de reducir el nitrógeno molecular a amonio, molécula que puede ser asimilada por todos los seres vivos (Abed & Golubic, 2009).

A pesar del poco estudio que se ha realizado en el Ecuador sobre los consorcios microbianos con cianobacterias, se conoce que pueden ser usados como biofertilizantes ya que reestructuran el suelo incorporando elementos esenciales para el desarrollo de las plantas, sin ocasionar daños a la salud ni al ambiente (Bejarano & Restrepo, 2002). Debido a la amplia actividad agrícola y ganadera que se ejerce en nuestro país, es necesaria la evaluación del efecto biofertilizante que los consorcios microbianos con cianobacterias pudieran ejercer sobre el desarrollo morfoagronómico y nutricional de los pastos.

### **1.3 Objetivos de la investigación**

#### **1.3.1 Objetivo general**

- Evaluar el potencial biofertilizante de tres consorcios de cianobacterias en el crecimiento y valor nutricional de pasto Ryegrass annual (*Lolium multiflorum*) a nivel de cámara de invernadero.

#### **1.3.2 Objetivos específicos**

- Obtener consorcios de cianobacterias a partir de diferentes muestras de suelo, biofilms y cortezas de árboles tomadas en las faldas del volcán Pasochoa.

- Producir biomasa en medio líquido a partir de consorcios de cianobacterias mantenidos en medio sólido.
- Preparar los biofertilizantes que serán empleados como tratamientos.
- Evaluar bajo biofertilización la evolución del crecimiento del Raygrass en masetas.
- Determinar la materia seca, humedad, proteína, fibra bruta, grasa y ceniza del Raygrass anual.
- Comprobar la sobrevivencia de cianobacterias en el Raygrass anual.

## **1.4 Marco Teórico**

### **1.4.1 Biofertilizantes**

Se denomina biofertilizante a un producto que se obtiene de la degradación y mineralización de materiales orgánicos, como estiércoles, restos de plantas y microorganismos propios del suelo (Benítez, 2005). Los biofertilizantes se utilizan en suelos agrícolas, con el propósito de mejorar sus propiedades físicas, químicas y biológicas. Es así que su aplicación mejora la estructura, textura y permeabilidad del suelo, ya que influye en su drenaje y aireación. En cuanto a las propiedades químicas del suelo, se aumenta su poder de absorción y se reduce las oscilaciones de pH, lo que permite mejorar la capacidad de intercambio catiónico, con lo que la fertilidad del suelo aumenta. La aireación y oxigenación del suelo también se ven favoridas, ya que el uso de biofertilizantes incrementa la actividad de los microorganismos aerobios (Montaño, 2005; Black & Mendiola, 2007).

Los biofertilizantes a base de desechos animales, tienen una larga historia de uso como fuente de fósforo, nitrógeno y carbono, para el crecimiento de cualquier tipo de cultivos (Benedetti *et al.*, 1998). Hoy en día se ha extendido el conocimiento de sus beneficios, por lo que se les ha dado una mayor atención a su forma de elaboración. Es así que se puede obtener un biofertilizante mucho más rico en nutrientes, al mezclar estiércol vacuno, con leche, melaza o jugo de caña (Restrepo, 1996). Entre otros biofertilizantes de excelente calidad, está la gallinaza, que se compone de eyecciones de las aves de corral y del material usado como cama, que por lo general es la cascarilla de arroz mezclada con cal (Bejarano, 2002).

Los últimos avances en ciencia y tecnología, han dado cuenta de la importancia que tienen los microorganismos dentro de los biofertilizantes. Es así que en ciertos países, ya se comercializan algunos productos que contienen únicamente bacterias, tal es el caso de *Rhizobium* (Kapulnik & Okon, 2002). En general, los microorganismos de interés agrícola, son aislados de la raíces de plantas, de suelos o de otros ambientes en los que se desarrollan, son multiplicados en un medio de cultivo específico, y posteriormente son transferidos a un sustrato, para ser utilizados como biofertilizantes (Bashan *et al.*, 2006; Bowen & Roviera, 1999; Alveár, 2004). Investigaciones a nivel mundial han dado a conocer que cierto tipo de microorganismos conocidos como cianobacterias, también tienen la capacidad de promover el crecimiento vegetal (Herrero *et al.*, 2001).

#### **1.4.2 Cianobacterias**

Las cianobacterias, son organismos procariotas, que se engloban en el reino Monera, y comparten características comunes con otras bacterias fotosintéticas, así como con el resto de las bacterias. Su nombre proviene del griego *ciano* = azul, por lo que también se las conoce como cianofíceas o algas verde azules. Se encuentran entre los seres más antiguos

conocidos, con fósiles de aproximadamente 3000 millones de años (Sarukhán, 2004; De León, 2000). Se conoce una amplia distribución de las cianobacterias, en regiones que van desde climas frío, tropicales hasta los más extremos. Habitan virtualmente cualquier lugar, ya sea en aguas continentales o marinas, en suelos, paredes húmedas, sobre rocas, desiertos e incluso sobre hielos antárticos. No solo se adaptan muy bien a cualquier ambiente, sino también poseen requerimientos nutricionales muy bajos, por lo que en los últimos años ha habido un interés creciente por conocer sus aplicaciones (Chapman & Wilcox, 2000).

En el campo de la biotecnología, las investigaciones han demostrado múltiples beneficios de las cianobacterias en distintas áreas. En la alimentación pueden ser empleadas como suplemento dietético, por su alto contenido proteico. Son usadas en la biorremediación de suelos y aguas, ya que facilitan los procesos de degradación de los contaminantes. En el área agrícola, en países Asiáticos principalmente, las cianobacterias han sido utilizadas como biofertilizantes, ya sea en forma de vida libre o en simbiosis con otras especies (Rizzo, 2006). Los nuevos estudios científicos, referentes a agricultura sostenible, se centran en el aislamiento de nuevas cepas de cianobacterias que garanticen una máxima producción en los cultivos (Peña & Reyes, 2007).

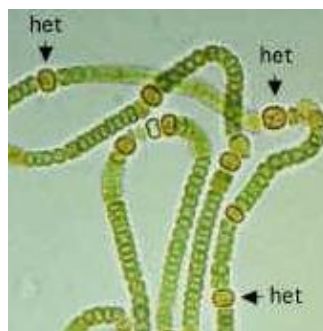
#### *1.4.2.1 Características de las Cianobacterias*

Las cianobacterias son microorganismos fotosintéticos, su tamaño varía de 0,5 a 70um de diámetro. Respecto a su estructura, carecen de núcleo y orgánulos delimitados por membranas. La pared celular es similar a la de bacterias Gram negativas, solo que su capa de petidoglucano es usualmente más gruesa (Méndez, 2006; Herrero *et al.*, 2001). Un gran número de cianobacterias unicelulares, coloniales y filamentosas presentan

una envoltura en el exterior de la membrana externa, que se la conoce como matriz, glicocálix o cápsula (Boone & Castenholz, 2001).

En el interior de sus células, la mayoría de cianobacterias poseen ficobilisomas hemisféricos o hemidiscoidales, los cuales son complejos agregados de proteína y pigmentos. Los pigmentos que se pueden encontrar en su interior son: aloficocianina, clorofila a, ficocianina, ficoeritrocianina y ficoeritrina, y son empleados por las cianobacterias para captar energía solar y sintetizar azúcares (Champan & Wilcox, 2000).

Las cianobacterias tienen una característica que muy pocos procariontes poseen, la capacidad de llevar a cabo la diferenciación celular. Esta diferenciación, que supone una expresión génica, lleva a la generación de células especializadas, como lo son los heterocistos. En estas células se lleva a cabo la fijación de nitrógeno por la enzima nitrogenasa, que es únicamente activa en ambiente anaeróbico (Luden, 2000). En ausencia de nitrógeno disponible en el medio, algunas cianobacterias filamentosas responden con un complejo sistema de señales y una de las células que se origina tras división celular, se diferencia a heterocisto (Flores & Herrero, 2009; Todar, 2004; Khanum *et al.*, 2008)



**Figura 1.1** Cianobacterias con heterocistos (Khanum *et al.*, 2008)

Respecto a su morfología, las cianobacterias muestran una gran variabilidad estructural, debido a que han desarrollado estrategias ecofisiológicas de adaptación a diferentes condiciones ambientales de temperatura, humedad, salinidad, irradiación solar y pH (Whitton & Potts, 2000, Méndez, 2006). Han sido clasificadas en base a caracteres morfológicos y ecológicos (Tabla 2.1, según De León 2000). Existen formas unicelulares, filamentosas, ramificadas o no, y con gran variación en el tamaño (Casamatta *et al.*, 2005).

**Tabla 1.1** Clasificación y tipos morfológicos de las Cianobacterias

DIVISION: Cyanophyta			
CLASE: Cyanophyceae			
SUBCLASE	ORDEN	ESPECIE	
<i>Coogonophycideae</i> organismos unicelulares , pueden tener la forma de falsos filamentos o incluso formar un pseudoparénquima no hay heterocistes	<i>Chroococcales</i> multiplicación por división binaria o endosporas	<i>Chroococcus</i>	
		<i>Mycrocystis</i>	
		<i>Gloeocapsa</i>	
		<i>Merismopedia</i>	
	<i>Chamaesiphonales</i>	<i>Dermocarpa</i>	
		<i>Chamaesiphon</i>	
		<i>Pleurocapsa</i>	
<i>Hormogonophycideae</i> cenobios filamentosos reproducción por hormogonios, acientos o hormosporas	<i>Nostocales</i> cenobios filamentosos sin diferenciación entre parte prostrada y parte erecta heterociste presente o ausente	<b>FAMILIA</b>	<b>ESPECIE</b>
		<i>Oscillatoriaceae</i> sin heterocistes	<i>Oscillatoria</i>
			<i>Spirulina</i>
			<i>Lyngbya</i>
		<i>Nostocaceae</i>	<i>Nostoc</i>
			<i>Anabaena</i>
		<i>Rivulariaceae</i>	<i>Rivularia</i>
			<i>Calothrix</i>
		<i>Scytonemataceae</i>	<i>Scytonema</i>
	<i>Plectonema</i>		
<i>Stigonematales</i>	<i>Stigonemataceae</i>	<i>Stigonema</i>	

**FUENTE:** Modificado de De León, 2000

### 1.4.3 Fijación Biológica de Nitrógeno por Cianobacterias

El nitrógeno, aunque es un elemento abundante en la corteza terrestre, es muy poco biodisponible, y la mayoría del nitrógeno que circula en los ciclos de materia, procede de la fijación biológica (Sylvia *et al.*, 2005).

Según Weaver *et al.* (2001), la fijación biológica de nitrógeno que consiste en la reducción del nitrógeno atmosférico a dos moléculas de amoníaco, es de gran significancia en los sistemas naturales y agrícolas en vista de la escasez y costo de los fertilizantes inorgánicos.

Los microorganismos que pueden usar el nitrógeno atmosférico, como única fuente para sintetizar sus compuestos en los que requieran nitrógeno se llaman diazotróficos (Mayea *et al.*, 1998). Según Coyne (2000) entre los microorganismos diazotróficos están las cianobacterias, que pueden existir como organismos de vida libre o también en asociaciones con otros microorganismos o plantas (Tabla 1.3 según Coyne, 2000).

**Tabla 1.2** Género de Cianobacterias implicadas en la fijación de nitrógeno

<b>GRUPO FISIOLÓGICO</b>	<b>TIPO DE ASOCIACIÓN</b>	<b>DEPENDENCIA DE OXÍGENO</b>	<b>GENERO REPRESENTATIVO</b>
Heterótrofo	Simbiótica	Aerobio	<i>Nostoc</i>
Autótrofo	Asimbiótica	Aerobio	<i>Gloeocarpa</i>
			<i>Trichodesmium</i>
			<i>Anabaena</i>
			<i>Calothrix</i>
			<i>Nostoc</i>
Autótrofo	Simbiótica	Aerobio	<i>Anabaena</i>
			<i>Nostoc</i>

**FUENTE:** Modificado de Coyne, 2000

Todos estos microorganismos contienen el complejo enzimático nitrogenasa, responsable de la conversión de nitrógeno atmosférico en amoníaco. El complejo nitrogenasa está formado por dos componentes protéicos, que deben su nombre a su composición metálica. La proteína que contiene hierro y molibdato es la dinitrogenasa (con abreviatura MoFe), mientras que la proteína que contiene solamente hierro se denomina dinitrogenasa reductasa (con abreviatura Fe). (Sylvia *et al.*, 2005). El componente MoF, tiene por misión la reducción de nitrógeno a amoníaco, y



el componente Fe, la transferencia a MoF de la energía necesaria para que éste pueda llevar a cabo aquella reducción (Dixon & Kahn, 2004).

Para que tenga lugar la reducción de nitrógeno se necesita la presencia de ambos componentes, energía biológica en forma de adenosín trifosfato (ATP), iones magnesio, poder reductor, protones y un ambiente anaerobio, debido a que la dinitrogenasa es inactivada en presencia de oxígeno. La fijación de nitrógeno consume una elevada cantidad de energía, aproximadamente 28 moléculas de ATP por molécula de nitrógeno reducida, energía que los microorganismos fotosintéticos obtienen de la luz solar (Dixon & Kahn, 2004).

#### *1.4.3.1 Mecanismo de fijación biológica de nitrógeno*

El mecanismo de fijación biológica de nitrógeno, explicada por varios autores (Dixon & Kahn, 2004; Sylvia *et al.*, 2005), conlleva ciertas etapas descritas a continuación:

1. La dinitrogenasa reductasa (Fe) acepta electrones de un bajo donador redox, como la ferredoxina reducida o flavodoxina (Fld), y se une a dos moléculas de MgATP.
2. Posteriormente, transfiere electrones, uno por cada ciclo a la dinitrogenasa (MoFe).
3. La dinitrogenasa reductasa (Fe) y la dinitrogenasa (MoFe) forman el complejo nitrogenasa, y un electrón es transferido. Dos moléculas de MgATP, se unen al complejo y son hidrolizadas a dos moléculas de MgADP y dos fosfatos (Pi).
4. La dinitrogenasa reductasa (Fe) y la dinitrogenasa (MoFe) se disocian y el proceso se repite, por lo menos ocho veces.
5. Cuando la dinitrogenasa (MoFe) ha obtenido el número suficiente de electrones, se une a una molécula de nitrógeno atmosférico, la reduce y

forma una molécula de  $\text{NH}_4^+$ , que luego de la formación de una segunda molécula, se dispone en forma de amoníaco e hidrógeno ( $2\text{NH}_3 + \text{H}_2$ )

6. Al final todo el ciclo se repite.

La ecuación [1.1] según Dixon & Kahn (2004), se deduce de la fijación biológica de nitrógeno:



Como se puede observar en la ecuación [1.1], la fijación biológica de nitrógeno, al igual que la fijación química e industrial, gasta mucha energía. Estequiométricamente, la enzima necesita 16 moléculas de MgATP para transformar una molécula de nitrógeno atmosférico, en dos moléculas de amoníaco (Sylvia *et al.*, 2005).

#### 1.4.3.2 Estrategias de protección de la nitrogenasa frente al oxígeno

El complejo enzimático nitrogenasa es activado por el oxígeno, y su síntesis es reprimida de manera irreversible. Para protegerse del oxígeno, los sistemas fijadores de nitrógeno han desarrollado, a lo largo de la evolución, una serie de estrategias fisiológicas, para excluir total o parcialmente al oxígeno de los lugares de fijación (Sylvia *et al.*, 2002).

Entre los mecanismos empleados por las cianobacterias de vida libre, destacan una mayor actividad respiratoria cuando la oxigenación aumenta, con lo que se consiguen niveles de oxígeno lo suficientemente bajos para que no resulten nocivos. En el caso de ciertas cianobacterias como *Anabaena*, *Richelia*, *Nostoc*, se desarrollan unas células especializadas denominadas heterocistos. La nitrogenasa se aloja exclusivamente en los heterocistos, con lo que se evita el contacto con el

oxígeno, existiendo una separación especial entre la fijación de nitrógeno y la fotosíntesis (Oelze, 2000; Espín, 2002).

#### **1.4.4 Uso de las Cianobacterias como biofertilizante**

A partir del descubrimiento de la existencia de microorganismos verde - azulados fijadores de nitrógeno, entre los años 1896 a 1901 se realizaron una gran cantidad de estudios para determinar la capacidad de estas especies para actuar como biofertilizantes. Así, las investigaciones se han centrado en establecer las condiciones de cultivo, propagación y obtención de biomasa de cianobacterias con la finalidad de aplicarse como biofertilizantes (Olivares, 2008; Hernández & Chailloux, 2001).

Entre las cianobacterias de vida libres, los géneros *Anabaena*, *Nostoc*, *Gloecapsa*, *Oscillatoria*, son los microorganismos que han sido utilizados en la agricultura de una forma más amplia frente a otras cianobacterias benéficas. Es así que *Nostoc* y *Anabaena* han resultado ser biofertilizantes muy útiles en el cultivo de arroz, en zonas afectadas por inundaciones (Rodríguez & Mendoza, 1995). Entre otros casos, las cianobacterias que conviven en simbiosis en estructuras específicas de las plantas, también han mostrado buenos resultados, al ser aplicados como biofertilizantes. Un estudio realizado en una zona templada de California, EEUU, demostró el potencial biofertilizante, del empleo del helecho de agua *Azolla* en simbiosis con la cianobacteria *Anabaena*. En este caso, se comprobó que el rendimiento de los arrozales biofertilizados, se correspondieron al rendimiento de aquellos en los que se usó 400 kg de sulfato de amonio por hectárea (Olaizola, 2003; Taiz & Zeiger, 1998).

En otros cultivos tales como el trigo, la aplicación práctica de la inoculación de *Azolla* – *Anabaena*, ha mostrado resultados altamente positivos. Según Ardila (2006) en su investigación, indica que resultado de

la biofertilización, observó aumento de peso fresco del orden de 25 – 30%, en las plantas de trigo biofertilizadas respecto a los controles no fertilizados.

#### 1.4.5 Generalidades del Raygrass anual (*Lolium multiflorum*)

El Raygrass es una especie originaria del Mediterráneo, sur de Europa, norte de África y Asia menor, aunque fue cultivada por primera vez en Italia y el sur de Europa, actualmente se encuentra ya naturalizada y distribuida en el Ecuador (León, 1999).

**Tabla 1.3** Clasificación taxonómica del Raygrass

Reino	Plantae
División	Magnoliophyta
Clase	Liliopsida
Orden	Cyperaceae
Familia	Poacea
Género	<i>Lolium</i>
Especie	<i>multiflorum</i>
Nombre científico	<i>Lolium multiflorum</i>

FUENTE: León, 1999

El Raygrass anual es una gramínea anual que bajo ciertas condiciones de manejo puede durar hasta varios años. Como pastura es la principal herramienta empleada en la alimentación de la ganadería debido a que es la fuente de nutrición más económica que existe (Bernal, 1994).

Entre los forrajes, el Raygrass es el de mayor interés para formación de praderas por su elevado potencial productivo frente a otras gramíneas. Se caracteriza por ser una especie de amplia reproducción en suelos fértiles y húmedos en los que se tiene una adecuada preparación del suelo

y elección de semilla (Muslera y Ratera, 2004). El establecimiento rápido, la buena capacidad de resiembra y velocidad de rebrote, hacen que el Raygrass anual, sea escogido por el ganadero cuando se requiere forraje como alimento inmediato (Hannaway *et al.*, 1999). La digestibilidad del Raygrass, sumado a su alto contenido nutricional, aproximadamente 15% de proteína y 60% de materia seca, le confieren la calidad necesaria para suplir los requerimientos de los animales de pastoreo (Bernal, 1994).

#### **1.4.6 Características morfoagronómicas del Raygrass**

El Raygrass es una especie de gramínea que posee un sistema radicular altamente ramificado y denso, posee numerosas raíces fibrosas y adventicias. El collar de esta planta está compuesto de tejido meristemático, el cual origina el incremento de la longitud de la hoja. Las células del collar dejan de dividirse cuando la hoja ha alcanzado su longitud máxima. Los tallos del Raygrass anual, son cilíndricos y la base es de color verde pálido a amarillento. Los tallos están compuestos de nudos y entrenudos, y de cada nudo nace una hoja. Las hojas son largas, entre 6 a 20 cm de longitud y anchas de 0.4 a 1 cm, con una nervadura muy bien marcada, el envés muy brillante, posee arrugas en la parte superior y sus márgenes son ligeramente ásperos. La inflorescencia del Raygrass, se presenta en forma de espiguillas, dispuestas alternativamente a lo largo del tallo, finalmente las espiguillas son multifloras y sésiles. (Muslera & Ratera, 2004; Alarcón, 2007; Bavera, 2008; Pincemin, 2007).

#### **1.4.7. Calidad del pasto**

La calidad de los pastos, en general, está determinada por el contenido nutricional que estos poseen. A medida que los pastos envejecen van perdiendo sus elementos nutritivos, parte del agua y material nitrogenado, que es abundante en ramas, tallos y hojas tiernas (Sánchez,

2007). Mientras mayor sea la calidad del forraje, menor será la cantidad necesaria que se deba suministrar al animal para suplir sus requerimientos (Bavera, 2008).

El valor nutritivo de los forrajes, depende en gran medida de factores como, el tipo de planta, las condiciones climáticas, la fertilidad del suelo, su ciclo vegetativo, entre otros (Sánchez, 2007; Colomatto, 2000). La mejor manera de conocer el valor nutritivo de los forrajes es mediante un análisis bromatológico. Mediante la bromatología se cuantifica los porcentajes de humedad, proteína, fibra, extracto etéreo y elementos libres de nitrógeno. La información obtenida, se aprovecha para conocer y cubrir las deficiencias nutritivas de los forrajes, empleados en la dieta animal (León, 2003; Arbaiza, 2008).

#### *1.4.7.1 Contenido de humedad*

El contenido de agua es el componente más abundante en los pastos, almacenándose en éstos alrededor del 75 al 80%, con lo que se consigue cubrir las necesidades de agua que requiere el animal para su normal desempeño (UWM, 2008). El agua que proporciona el pasto en el cuerpo animal es de vital importancia. Contribuye con el transporte de nutrientes y esto a su vez con una digestión y metabolismo. El agua, también contribuye con la regulación de la temperatura corporal y proporciona un ambiente líquido cuando el feto del animal se encuentra en desarrollo (León, 2003).

#### *1.4.7.2 Materia seca*

La materia seca es un parámetro proporcional a la madurez de la planta, pero inversamente proporcional a la cantidad de la misma. Un pasto más viejo posee mayor cantidad de materia seca, pero a la vez su

contenido proteico disminuye. Por otro lado, un pasto joven establecido bajo un sistema de cultivo adecuado, poseerá menos materia seca y mayor calidad nutricional en su composición (García, 2009, Batallas, 2008).

#### *1.4.7.3 Proteína bruta*

Los componentes elementales de las proteínas son los aminoácidos. Muchas veces, varias cadenas de aminoácidos están ligadas a una fuente de azufre o un grupo fosfato. En promedio, una proteína contiene 16% de nitrógeno. Típicamente, en el laboratorio, se mide la cantidad de nitrógeno y no la cantidad de proteína. La cantidad de proteína depende de la pastura, así para el Raygrass anual se ha reportado 147 g de proteína cruda/kg de materia seca, antes de la floración y 113 g de proteína cruda/kg de materia seca, al inicio de la floración (León, 2003). Dentro de la planta, alguna proteína puede estar ligada a la pared de la célula, pero la mayoría, se solubiliza dentro del contenido de la célula (León, 2003; UWM, 2008).

#### *1.4.7.4 Fibra bruta*

Los hidratos de carbono, que le confieren fibra a los pastos son la celulosa, hemicelulosa y lignina, según su etapa de desarrollo. Los hidratos de carbono, constituyen el esqueleto de las plantas y pueden comprender entre 40 y 80% de la materia seca. Mientras mayor sea la concentración de fibra, las plantas serán más rígidas y fuertes (Sergio. 2009).

En análisis de laboratorio, la muestra de pasto desengrasada, se trata sucesivamente con soluciones de ácido sulfúrico e hidróxido potásico para eliminar elementos no grasos que se solubilizan con estos compuestos. La pérdida de peso debida a la calcinación corresponde a la fibra bruta de la muestra en el ensayo (Bavera, 2000).

#### *1.4.7.5 Grasas*

El contenido de grasas lo conforman lípidos libres, como lípidos enlazados. En las hojas de los pastos, se los encuentra en concentración de 3 al 10% y, generalmente disminuye con la madurez. Los lípidos tienen diferentes componentes, pero la mayor parte de ellos están compuestos por galactolípidos y fosfolípidos, la mayor parte de ellos se encuentra en los coloroplastos. El ácido linoleico constituye entre el 60 y 75% del total de los ácidos grasos, seguido por el ácido palmítico (León & Rojas, 2003).

El contenido de lípidos libres de la grasa, pueden ser extraídos por disolventes menos polares, como el éter etílico, mientras que los lípidos enlazados requieren de disolventes más polares. Para determinar la cantidad de grasa que contiene un forraje se realizan diferencias de peso de la muestra en estudio (Arbaiza, 2008; León, 2003; Tapia, 2006).

#### *1.4.7.6 Ceniza*

El residuo inorgánico que queda después de quemar la materia orgánica es lo que se conoce como ceniza, y el porcentaje obtenido, es un indicativo de los nutrientes que la planta ha asimilado después del proceso de fotosíntesis (Montero, 2008). El contenido de ceniza de una planta, da una idea de cómo deben fertilizarse los pastos. Los pastos normalmente contienen de un 5 a 10% de ceniza, contenido que da una idea de la fertilización del forraje ya que es aquí donde se encuentran concentrados los componentes minerales, por lo que es considerado también como una medida de calidad (Tapia, 2006).



## **1.5 Sistema de hipótesis**

### **1.5.1 Hipótesis nula**

- Los tres consorcios microbianos con cianobacterias presentan similares efectos fertilizantes en el Raygrass.
- Los consorcios microbianos con cianobacterias, como los fertilizantes orgánicos tienen el mismo efecto sobre las plántulas de Raygrass en crecimiento y valor nutricional.
- Los tratamientos que constan de consorcios microbianos con cianobacterias tienen el mismo efecto que un fertilizante químico en el Raygrass.

### **1.5.2 Hipótesis alternativa**

- Los tres consorcios de cianobacterias presentan diferentes efectos sobre las plántulas de Raygrass.
- Los consorcios de cianobacterias y los fertilizantes orgánicos muestran diferentes efectos en el crecimiento y valor nutricional del Raygrass.
- Los tratamientos que constan de consorcios microbianos con cianobacterias, no presentan el mismo efecto que los fertilizantes químicos.

## **CAPÍTULO 2: MATERIALES Y MÉTODOS**

### **2.1 Participantes**

En el presente estudio participaron, como directora, la M.C. Alma Koch y como codirector, el ingeniero Pedro Romero docentes de la carrera de Ingeniería en Biotecnología, ESPE.

El Señor Pablo Espinosa, colaboró en calidad de pasante.

### **2.2 Zona de estudio**

La tesis fue desarrollada en el Centro de Investigaciones Científicas (CEINCI) en la ESPE, campus Sangolquí. Ubicación geográfica, Provincia de Pichincha, Cantón Rumiñahui, situación geográfica: 0° 18' 53", 52° S.

Las muestras de tapetes microbianos y suelo, fueron tomadas del Sector San Antonio al Oriente del volcán Pasochoa. Ubicación geográfica: altura: 2991 m, Latitud S 00° 26, 085'.

Los análisis bromatológicos se realizaron en el laboratorio Multianalítica. Ubicación geográfica, Provincia de Pichincha, Cantón Quito. Localización: Capitán Edmundo Chiriboga N47-154 y Capitán Anibal Páez.

### **2.3 Periodo de investigación**

La presente investigación se inició en Marzo del 2011 y finalizó en Enero del 2012.

## 2.4 Diseño

Para la fase experimental desarrollada en cámara de invernadero, se empleó un diseño completamente al azar (DCA) en el cual se investigó la influencia de los diferentes fertilizantes (tratamientos), sobre las variables morfoagronómicas del Raygrass anual. Del diseño planteado se realizaron cinco repeticiones de cada tratamiento.

Para la evaluación de las variables nutricionales, analizadas en laboratorio se realizaron tres repeticiones por tratamiento.

Los resultados se analizaron mediante el empleo del programa estadístico Infostat. Se realizó un Análisis de Varianza (ANOVA) para los datos recogidos de las variables morfoagronómicas y nutricionales. (Gutierrez & de la Vara, 2008).

Para la evaluación del experimento se empleó como factor 1, a los siguientes biofertilizantes y, como factor 2, a la cantidad de fertilizante empleado según se indica en la tabla 2.1.

Para determinar la cantidad a usarse, se realizaron pruebas previas al ensayo experimental, aplicando varios volúmenes de consorcios microbianos (Iglesias & Montero, 2005). Finalmente de acuerdo a los resultados, se decidió trabajar con las cantidades que se detallan en la tabla 2.1 de acuerdo a cada tratamiento.

**Tabla 2.1** Tratamientos aplicados a semillas de Raygrass

<b>Tratamiento</b>	<b>Descripción</b>	<b>Cantidad</b>
CM <sub>A</sub>	Consortio microbiano con cianobacterias A	40 mL
CM <sub>B</sub>	Consortio microbiano con cianobacterias B	40 mL
CM <sub>C</sub>	Consortio microbiano con cianobacterias C	40 mL
TBV	Preparado a base de estiércol de vaca	30 mL
TBG	Gallinaza	30 g
TQ	Fertilizante químico	40 mL
TB	Testigo (Agua destilada)	40 mL

## 2.5 Procedimiento

La investigación realizada en laboratorio abarcó la obtención de consorcios microbianos a partir de las muestras recolectadas, la selección de consorcios, su mantenimiento y la producción de biomasa. A nivel de cámara de invernadero, se realizó la evaluación de la biomasa como biofertilizante, sobre las variables morfoagronómicas del Raygrass anual. Finalmente se cuantificó las variables nutricionales del Raygrass anual después de aplicados los tratamientos fertilizantes.

### 2.5.1 Recolección de muestras

La zona escogida para el muestreo fue el sector San Antonio, ubicado al Oriente del volcán Pasochoa. Se recolectaron muestras en fundas estériles como se describe a continuación:

**Musgos y Líquenes:** se recolectaron segmentos de corteza de árbol de aproximadamente 6 cm. Se procuró tomar aquellos que se encontraban húmedos y denotaban un verde profundo sobre su superficie, lo que es

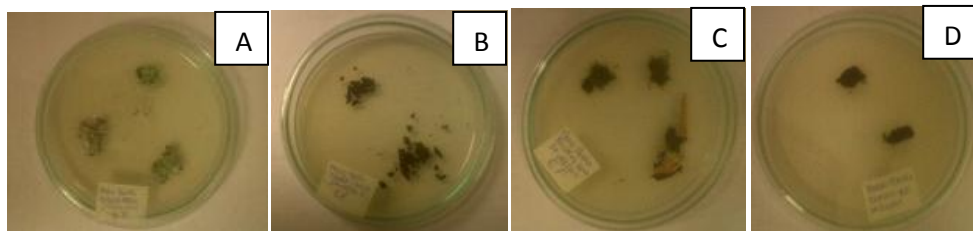
indicativo de la posible presencia de consorcios microbianos con cianobacterias.

**Tapetes bacterianos:** se tomaron muestras de tapetes que se encontraban cercanos a fuentes de agua y, sobre rocas en donde se observó una coloración marrón a verde.

**Suelo:** las muestras que se emplearon fueron de zonas donde el suelo se encontró húmedo. Se utilizaron palas para tomar muestras de suelo a aproximadamente 5 cm de profundidad (Espino, 2001).

## 2.5.2 Obtención de consorcios microbianos con cianobacterias

Para la obtención de los consorcios, se tomaron con pinzas estériles las muestras recolectadas en el Pasochoa y se procedió a inocular directamente sobre medio BG-11<sub>0</sub> sólido y sin nitrato de sodio (ver composición en el anexo A), medio específico para el crecimiento de cianobacterias fijadoras de nitrógeno (Rippka *et al.*, 1979).



**Figura 2.1** Siembra directa de muestras en medio BG-110 sólido. A) Corteza de árbol B) Tierra negra C) Biofilms sobre rocas D) Agregados babosos sobre laderas (Freire, 2012).

A partir del cultivo de las muestras en el medio BG-11<sub>0</sub> sólido, se incubaron las cajas petri en una repisa con un fotoperiodo de 16 horas de luz y 8 de oscuridad, con una irradiancia de 1000 Lux y a temperatura ambiente (25°C) por 20 días. Se realizaron observaciones periódicas del

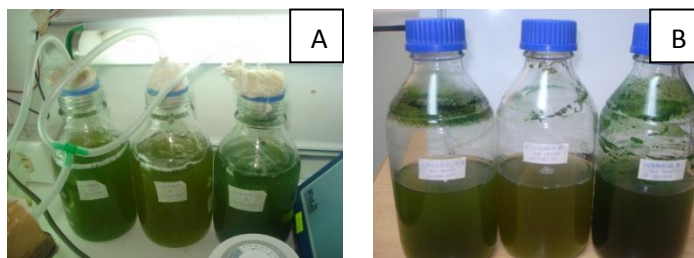
aspecto de las macrocolonias de los cultivos. Para la observación, se empleó un microscopio cabezal trinocular marca Olympus modelo CX- 31. Las placas se prepararon de forma periódica y, directamente de los cultivos. De las observaciones se registraron las características más sobresalientes de los consorcios observados.

### **2.5.3 Masificación y mantenimiento de los consorcios microbianos con cianobacterias.**

A partir del crecimiento de los consorcios de cianobacterias en medio sólido, se seleccionaron tres tipos de consorcios que mostraron mejor crecimiento en cajas petri, para pasarlos a medio BG-11<sub>0</sub> líquido. Se realizó un raspado de la biomasa, se la colocó en un tubo falcon de 50 mL con núcleos de ebullición y medio BG-110 líquido y se homogenizó la muestra con vortex MIXER VM-300.

La biomasa homogenizada, de los tres consorcios microbianos (CM<sub>A</sub>, CM<sub>B</sub>, CM<sub>C</sub>), se transfirió de los falcon a frascos boeco de 500 mL. Los frascos de vidrio se llenaron con 400 mL de medio de cultivo estéril BG11<sub>0</sub>, fueron cubiertos con tapones de algodón y aireados mediante mangueras conectadas a una bomba de pecera. Por el otro lado de las mangueras, se insertaron pipetas Pasteur de vidrio por donde el aire fluía hacia el medio de cultivo (Rippka *et al.*, 2001; Koch *et al.*, 2008). Se mantuvo los frascos, en la cámara de cultivo con intensidad de luz de 1000 lux, fotoperiodo 16 h luz y 8 h de oscuridad, además de agitación constante (figura 2.2 A).

Se mantuvieron los consorcios microbianos (CM<sub>A</sub>, CM<sub>B</sub>, CM<sub>C</sub>), bajo las condiciones indicadas hasta alcanzar suficiente biomasa (aproximadamente  $5 \times 10^7$  cel/mL) para inocularlos en frascos boeco de 1 L, con 900 mL de cultivo líquido.



**Figura 2.2** Mantenimiento de consorcios de cianobacterias A) Consorcios microbianos aireándose con fotoperiodo 16:8 B) Frascos Boeco conteniendo los consorcios en medio líquido (Freire, 2012).

## 2.5.4 Análisis de la biomasa

### 2.5.4.1 Cinética de crecimiento

El crecimiento de los tres consorcios microbianos ( $CM_A$ ,  $CM_B$ ,  $CM_C$ ), se cuantificó por espectrofotometría en el equipo Genesys 10UV Scanning Thermo Scientific. Previa homogenización de los cultivos, se tomó 2 mL en un vial y se midió la absorbancia a una longitud de onda de 750 nm. El procedimiento se realizó cada 3 días (Loreto *et al.*, 2003).

### 2.5.4.2 Recuento celular

El conteo celular (células/mL) se determinó mediante conteo directo en cámara de Neubauer con un microscopio cabezal trinocular marca Olympus modelo CX-31. Se tomó 1 mL de la muestra y se llenó la cámara a una velocidad homogénea, evitando una mala distribución de las células y la formación de burbujas. Para las muestras muy concentradas, se utilizó un factor de dilución. Para el cálculo de las células por mililitro se empleó la siguiente fórmula descrita por García y colaboradores (2002):

$$cel / mL = \bar{XC} \times 10^4 \times fd$$

$\bar{XC}$  = promedio de células contadas en la cuadrícula de 25 cuadrados

$fd$  = factor de dilución

## 2.5.5 Elaboración de los biofertilizantes

### 2.5.4.1 Preparado de estiércol vacuno

La elaboración del preparado de estiércol vacuno, se realizó en dos etapas. Para la primera etapa, se usó un recipiente plástico, en el cual se colocó 690 g de estiércol vacuno, 28 mL de jugo de caña, 28 mL de leche y 10 mL de agua. Se revolvió hasta obtener una pasta homogénea. En un recipiente aparte se disolvió sulfato de magnesio en agua tibia (aproximadamente 60°C) y se adicionó a la mezcla (Restrepo, 2001).

El recipiente plástico fue tapado y dejado en reposo en un lugar protegido del sol y la lluvia por 25 días. Al finalizado el tiempo de reposo (fermentación), se continuó con la segunda etapa de preparación del biofertilizante (Restrepo, 2001).

En la segunda etapa, se combinó 20 g de azufre con agua hasta formar una pasta. Se calentó la pasta y se añadió 10 g de cal y 200 mL de agua y se mezcló hasta que se obtuvo una color café oscuro, conocido como caldo sulfocálcico (Restrepo, 2001). El caldo sulfocálcico se añadió a la primera preparación, se mezcló y el biofertilizante estuvo listo para su uso.



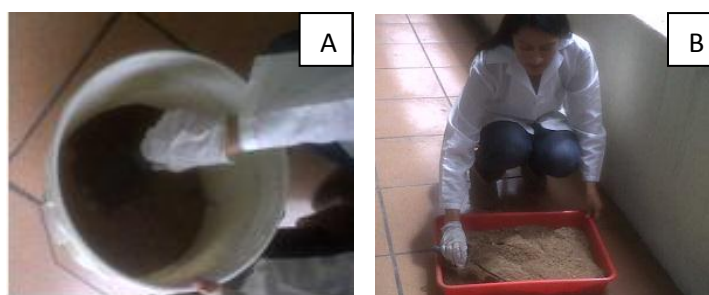
**Figura 2.3** Preparación de biofertilizante vacuno A) mezcla de ingredientes B) Adición de sulfato de magnesio y almacenamiento (Freire, 2012).



#### 2.5.4.2 Preparado de gallinaza

Para la preparación del biofertilizante gallinaza, se usó un recipiente plástico en el cual se colocó por capas: cascarilla de arroz, tierra, estiércol de gallinaza, carbón y salvado. Se disolvió panela en agua y se aplicó uniformemente al recipiente mientras se fueron mezclando todos los ingredientes. Se realizó la prueba de puño para controlar la humedad de la mezcla. La prueba de puño se efectuó tomando una cantidad del biofertilizante en la mano, se la apretó y se verificó que no escurra agua y que al soltarla se desmorone fácilmente. Se cubrió el recipiente con un costal y se lo dejó reposar por 15 días. Durante los primeros 4 días se volteó la mezcla dos veces por día, para evitar que la temperatura sobrepase los 50 C°, lo que fue controlado con un termómetro, al cabo del sexto día se realizó una vuelta al día (Bejarano, 2002).

A los 15 días de preparado el biofertilizante, se verificó que su temperatura era igual a la temperatura ambiente. Se observó que tenía un aspecto de polvo arenoso y contextura suelta. Dichos parámetros fueron un indicativo de que el biofertilizante estaba maduro y listo para usarse (Bejarano, 2002).



**Figura 2.4** Preparación de Gallinaza A) colocación en capas de tierra, estiércol de gallina seco, carbón, cascarilla de arroz y salvado B) Secado de la gallinaza mostrando una consistencia suelta (Freire, 2012).

### **2.5.5 Preparación del fertilizante químico**

Se preparó el fertilizante químico realizando una mezcla de los siguientes reactivos químicos: nitrato de calcio como fuente de nitrógeno sulfato de potasio, fosfato ácido de potasio, sulfato de magnesio heptahidratado, sulfato ferroso heptahidratado, cloruro de potasio, sulfato de manganeso monohidratado, ácido bórico, sulfato de zinc heptahidratado, sulfato de cobre pentahidratado y molibdato de sodio, elementos indispensables para el desarrollo de plantas (Ulloa, 1993).

Se midió el pH del fertilizante químico y se lo almacenó en refrigeración hasta su uso como tratamiento en la investigación.

### **2.5.6 Preparación y esterilización de semillas y sustrato**

#### *2.5.6.1 Preparación del sustrato*

Como sustrato, se empleó tierra negra que fue recolectada de la misma zona donde se recogieron las muestras de los consorcios microbianos (Pasochoa). Debido a que el Raygrass crece mejor en suelos franco arcillosos, se decidió usar la tierra negra mezclada con arena y arcilla. La arena crea espacios por donde puede penetrar más fácilmente el agua y las raíces, mientras que la arcilla fija aniones (Iglesias & Montero, 2005). La mezcla que se realizó fue en un 50% tierra negra 40% arena y 10% arcilla (Bertch, 1998).

De la tierra negra, como de la arena y arcilla fueron retiradas impurezas como piedras o trozos de ramas. Posteriormente fue tamizada en mallas # 12 (figura 2.5 A) y se la dejó secar con luz solar en bandejas plásticas en la cámara de invernadero (Lotario *et al.*, 1995).

Se introdujo la tierra negra, arena y arcilla en bolsas de tela para su esterilización en autoclave a 121°C y 15 psi de presión por 30 min. Una vez estéril, se mezcló la tierra negra, la arena y la arcilla hasta que el tono de sustrato quedó uniforme. Se procedió a rellenar las macetas empleadas en el diseño experimental (Lotario *et al.*, 1995).



**Figura 2.5** Proceso de reparación del sustrato. A) Tamizado de la tierra B) Secado en bandejas y esterilizado en bolsas de tela C) Colocación de tierra negra D) Adición de arena E) Colocación de arcilla F) Mezcla del sustrato (Freire, 2012).

#### 2.5.6.2 Desinfección y siembra de las semillas

Para la desinfección de las semillas de Raygrass, se procedió a lavarlas con abundante agua de la llave con la finalidad de eliminar impurezas. Se realizó tres lavados consecutivos con agua destilada, se las sumergió en un vaso con alcohol al 70% durante tres minutos y se las lavó con abundante agua destilada estéril. Se las dejó reposar en el agua del último lavado por 10 minutos (Estévez, 1993 modificado).

Para la siembra de las semillas, una vez que las macetas estuvieron llenas del sustrato, se procedió a colocar aproximadamente 15 semillas de Raygrass con ayuda de una pinza estéril a una profundidad de 5 cm y se las cubrió con el sustrato. Posteriormente se regó las macetas con agua destilada y se las colocó en la cámara de invernadero con fotoperiodo un 12 horas de luz y 12 de oscuridad (Santillán, 2005).



**Figura 2.6** Desinfección de semillas. A) Desinfección de semillas con alcohol al 70% B) Semillas listas para inocular en el sustrato (Freire, 2012).

### 2.5.6 Aplicación de los tratamientos fertilizantes

Se realizó la aplicación de los fertilizantes siguiendo el diseño completamente al azar (DCA). De cada tratamiento se hicieron cinco repeticiones. Los tratamientos que consistieron de consorcios microbianos con cianobacterias fueron tres, denominados como  $CM_A$ ,  $CM_B$ ,  $CM_C$ . Dichos consorcios fueron aplicados en volumen de 40 mL tanto al sustrato como a las hojas de Raygrass (Cruz, 2009).

Los consorcios microbianos fueron inoculados en fase exponencial con una absorbancia de 0,80 medida a 750 nm, correspondiente a una densidad celular de  $5,01 \times 10^7$  cel.mL<sup>-1</sup> (modificado de Loreto *et al.*, 2003).

El biofertilizante preparado a base de estiércol vacuno y el de gallinaza, fueron aplicados a las plántulas de Raygrass en cantidad de 30 mL y 30 g por maceta respectivamente. El tratamiento químico, fue aplicado

en un volumen de 40 mL sobre las plántulas de Raygrass inoculadas en las macetas (Cruz, 2009; Santillán, 2005).

Los tratamientos de los consorcios microbianos con cianobacterias fueron añadidos a partir de la inoculación de las semillas de Raygrass en el sustrato y cada 10 días durante todo el periodo de cultivo (Iglesias & Montero, 2005).

Se usó también un tratamiento control que consistió en la aplicación de agua destilada a las semillas de Raygrass (Santillán, 2005; Iglesias & Montero, 2005).



**Figura 2.7** A) Volumen de los consorcios a inocular B) Aplicación de consorcios de cianobacterias al sustrato C) Macetas con Raygrass y tratamientos en cámara de invernadero (Freire, 2012).

## 2.5.7 Análisis de variables morfo agronómicas del Raygrass

### 2.5.7.1 Altura de la planta de Raygrass

La evaluación de esta variable se realizó a los 8, 16, 24 y 34 después que las semillas de Raygrass emergieron. Para ello, se identificó con una cinta roja la planta que primero emergió a la superficie del sustrato y fue a la cual se le dio el seguimiento de la altura. Para la medición, se utilizó una

regla con la que se tomó la altura de la planta en centímetros, desde el borde del suelo hasta el extremo de la hoja superior (Pulgarin, 2011).



**Figura 2.8** Seguimiento de la altura del Raygrass. A) Germinación de semillas de Raygrass B) Selección de una planta de Raygrass C) Medición de altura de hojas de Raygrass identificadas (Freire, 2012).

#### 2.5.7.2 Cobertura

El porcentaje de cobertura se evaluó de forma visual a los 20 y 34 días de siembra en masetas de las plántulas de Raygrass. Se calificó según la escala empleada por el Programa de Ganadería y Pastos de la estación Santa Catalina del INIAP, como se muestra en la tabla 2.9.



**Figura 2.9** Observación visual del porcentaje de cobertura de la masetas con el Raygrass A) tratamiento CMA B) Tratamiento CMB C) Tratamiento CMC (Freire, 2012).



**Tabla 2.2** Escala de cobertura de Pastos

VALOR	SIGNIFICADO
81 -100%	Muy bueno
61 - 80%	Bueno
41- 60%	Regular
0-40%	Deficiente

### 2.5.7.3 Medición de longitud de la raíz principal

La longitud de la raíz se midió a los 35 días de siembra. Una vez que las plantas de Raygrass fueron cosechadas de las macetas, se eliminó el exceso de tierra y sobre una superficie plana se midió la raíz principal.



**Figura 2.10** Medición de la longitud de la raíz A) cosecha de la hoja seleccionada para medición de la raíz principal B) medida de la raíz principal C) recolección del Raygrass para análisis bromatológicos (Freire, 2012).

### 2.5.8 Supervivencia de consorcios microbianos

Se realizó el análisis de supervivencia a los tres consorcios microbianos con cianobacterias (CM<sub>A</sub>, CM<sub>B</sub>, CM<sub>C</sub>) que fueron aplicados tanto en el sustrato como en hojas de Raygrass. Se tomó aproximadamente 1 g del sustrato con ayuda de una espátula estéril. En el caso de las hojas, con una pinza estéril se sujetó la punta de una hoja, y se recortó con unas tijeras un segmento.

Las muestras del sustrato como de las hojas fueron colocadas en cajas petri con medio BG11<sub>0</sub> sólido. Se las incubó en cámaras con luz artificial con un fotoperiodo 16 horas de luz y 8 de oscuridad durante 30 días, periodo en el cual se observó si los consorcios de cianobacterias tenían la capacidad de crecer en el medio de cultivo.



**Figura 2.11** Siembra de muestras para comprobación de sobrevivencia de consorcios de cianobacterias A) sustrato B) hojas C) incubación (Freire, 2012).

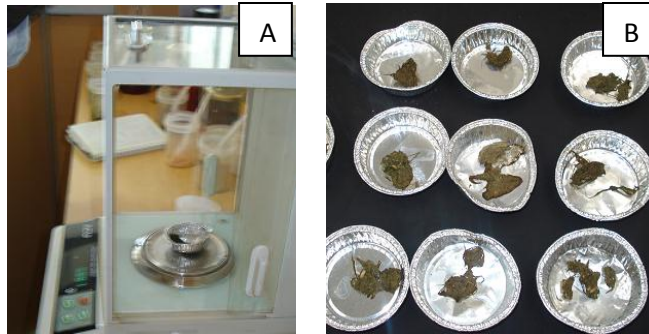
## 2.5.9 Análisis bromatológico del Raygrass

### 2.5.9.1 Determinación de humedad

Se calentaron cápsulas a 130°C por una hora, y se dejó enfriar en el desecador por aproximadamente 10 min hasta que alcanzaron la temperatura ambiente y se pesó. Posteriormente se colocó 3 g de las muestras de Raygrass bien homogenizadas (Tapia, 2006).

Utilizando unas pinzas, se colocó las cápsulas con las muestras en la estufa a 130°C por una hora. Al finalizar la hora de secado, se sacó las cápsulas con las pinzas y se las transfirió a un desecador. Se las pesó tan pronto alcanzaron la temperatura ambiente (Tapia, 2006).





**Figura 2.12** A) Pesado de las muestras en las cápsulas B) Cápsulas de aluminio con muestras de Raygrass secadas en la estufa (Freire, 2012).

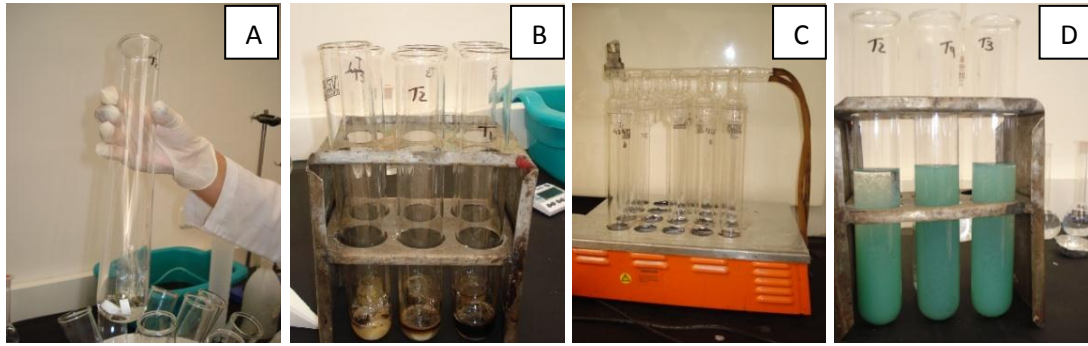
#### 2.5.9.2 Determinación de Proteína

La determinación de proteína consta de tres pasos: digestión, destilación e hidrólisis de la muestras.

Para efectuar la digestión de la muestra, se pesó 0.5 g de Raygrass dentro de un molde de papel libre de nitrógeno, se colocó dentro del tubo de Kjeldhal, y se agregó a cada tubo una tableta de catalizador y 15 mL de ácido sulfúrico. Los tubos fueron ubicados dentro de las celdas del digestor, se colocó el sistema de extracción de gases junto con la bomba de succión de agua y se abrió la llave de agua para generar vacío (UWM, 2008).

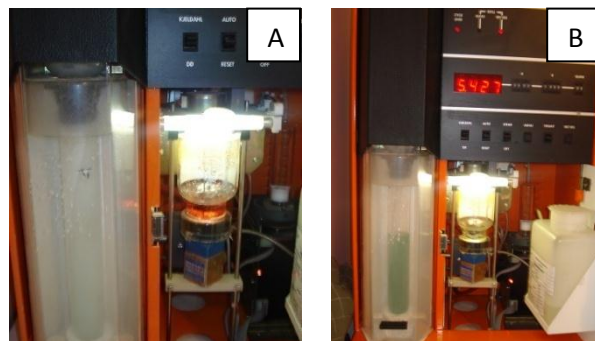
Se encendió el digestor y cuando alcanzó 400 °C, se tomó el tiempo de 30 min hasta completar la digestión.

Al término del tiempo, se comprobó si las muestras estaban claras y transparentes, se dejó enfriar los tubos y se adicionó 70 mL de agua desionizada (Bavera, 2008).



**Figura 2.13** Proceso de digestión de muestras de Raygrass A) tubo de kjeldahal con muestras y catalizadores B) Tubos con ácido sulfúrico C) digestión de las muestras D) muestras digeridas (Freire, 2012).

Para iniciar la destilación de las muestras, se verificó que exista la suficiente cantidad de NaOH al 40% en el tanque de álcali y que el volumen de HCl 0,1 N en el tanque del titulante sea suficiente. Se adicionó 25 mL de  $H_3BO_3$  en el reservorio de destilación, y se encendió el equipo de destilación de Proteína IFQ-12. El equipo destiló y tituló automáticamente desplegando el valor del volumen de HCl 0.1 N utilizado para titular la muestra, valor que fue empleado para realizar los cálculos posteriores (Bavera, 2008).

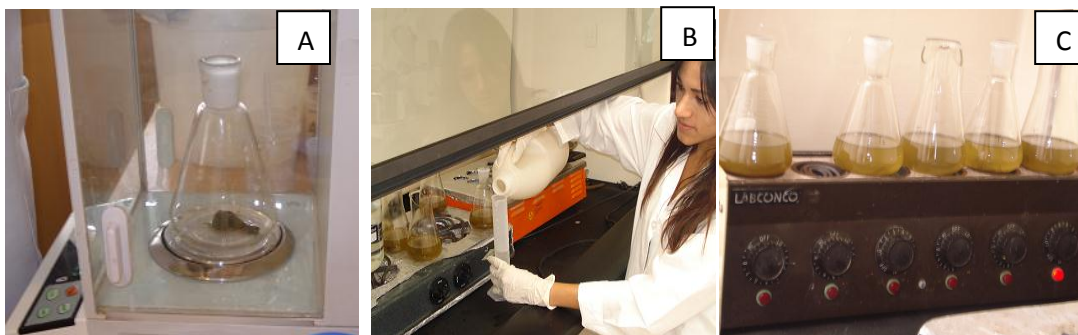


**Figura 2.14** A) Preparación del equipo de destilación de proteína B) Titulación de muestras (Freire, 2012).

### 2.5.9.3 Determinación de grasa

El porcentaje de grasa de las muestras, se obtuvo en tres pasos: hidrólisis, filtración y extracción de las muestras.

Para hidrolizar las muestras, se pesó alrededor de 3 g de cada muestra en un erlenmeyer, se añadió 70mL de agua desmineralizada y 60 mL de ácido clorhídrico concentrado grado técnico. Se sometió a hidrólisis mediante calentamiento en una cocineta. A partir del comienzo de la ebullición, se tomó un tiempo de 30 min (Medina, 2009).

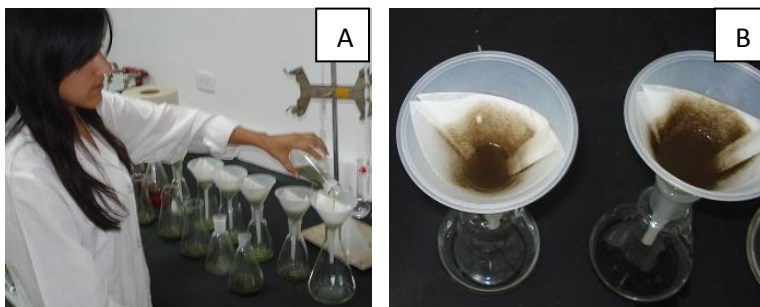


**Figura 2.15** Proceso de Hidrólisis del Raygrass A) Pesaje de las muestras B) Adición de agua desmineralizada C) Calentamiento de las muestras (Freire, 2012).

Terminado el tiempo de hidrólisis, se retiró los erlenmeyers y se esperó por unos minutos hasta que las muestras no emitieron vapores. Fueron filtradas con ayuda de un papel filtro doblado y humedecido para evitar la pérdida de muestra. Se lavó la muestra retenida en el papel filtro con 400 mL de agua caliente para eliminar todo el ácido (Medina, 2009).

Una vez concluido el lavado, se retiró con cuidado los papeles filtro y se los colocó en una cápsula, identificándolos con el número correspondiente a las muestras. Se llevó las cápsulas a la estufa a 130°C

por 25 min. Cuando los papeles estuvieron fríos, se los introdujo cuidadosamente en los capuchones de celulosa (Medina, 2009).



**Figura 2.16** Proceso de filtración en la determinación de grasas A) lavado de las muestras con agua B) Grasa retenida en el papel filtro (Freire, 2012).

Para finalizar el proceso, se extrajo la grasa. Se tomó el peso de un vaso previamente lavado y secado a 130°C por una hora. Se encendió el extractor de grasa y se abrió el flujo de agua del condensador. Se adhirió a las columnas de extracción los capuchones que contenían las muestras. Se añadió alrededor de 40 mL de hexano para cubrir las porciones de prueba en posición de inmersión (Medina, 2009).

Se colocó los vasos debajo de las columnas de extracción y se los fijó cerrando el equipo con la palanca prevista. Las columnas fueron puestas en posición de inmersión y se aseguró que los dedales se encuentren sumergidos en el solvente. Se sometió a ebullición por 25 min (Medina, 2009).

Al término del tiempo, se levantó los capuchones y se colocó en la posición de lavado y extracción por 40 min. Se cerró las llaves de las columnas de extracción y se destiló la mayor cantidad de solvente posible de los vasos hasta que se recuperó el hexano y se alcanzó sequedad aparente. A los 20 min, se retiró los vasos del extractor de grasa y se los

colocó en la Sorbona para finalizar la evaporación del solvente (Medina, 2009).

Después de retirados los vasos de la Sorbona, se los colocó en la estufa a 130°C por 30 min. Finalmente se llevó los vasos con la grasas al desecador y se los dejó enfriar hasta que alcanzaron la temperatura ambiente y se tomó el peso del vaso con la muestra (Medina, 2009).



**Figura 2.17** Extractor de grasa Soxhlet con las muestras de Raygrass (Freire, 2012).

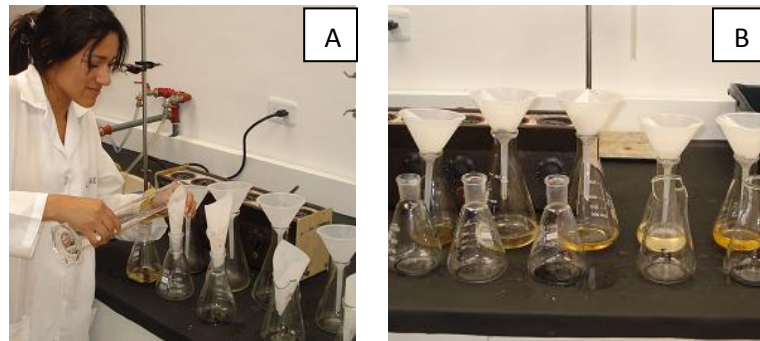
#### 2.5.9.4 Determinación de la fibra bruta

El porcentaje de fibra de las muestras, se obtuvo en dos pasos: hidrólisis ácida, seguida de una hidrólisis básica de la muestra.

Se pesó aproximadamente 0,5 g de las muestras en un erlenmeyer de 250 mL, se añadió 100 mL de ácido sulfúrico con una concentración de 1,25% y se los dejó hervir por 30 min. Se filtró las muestras en un papel filtro con aproximadamente 400 mL de agua caliente (Arbaiza, 2009).

Para la etapa de hidrólisis básica, se colocó en forma cónica los papeles filtro y se añadió hidróxido de sodio con una concentración de 1,25% y se los dejó hervir por 30 min.

Se taró en la estufa papeles cuantitativos a 130°C por 15 min. Se los retiró de la estufa y se los dejó en el desecador, hasta que alcanzaron la temperatura ambiente. Posteriormente se los pesó y codificó. Se tomó los papeles cualitativos, se los colocó en los embudos y se filtró las muestras de los erlenmeyers con aproximadamente 400 mL de agua caliente. Los papeles filtro fueron colocados en la estufa a 130°C por 20 min. Se los retiró de la estufa y se los dejó en el desecador, hasta que alcanzaron la temperatura ambiente. Finalmente se registraron los pesos de los papeles cualitativos (Arbaiza, 2009).

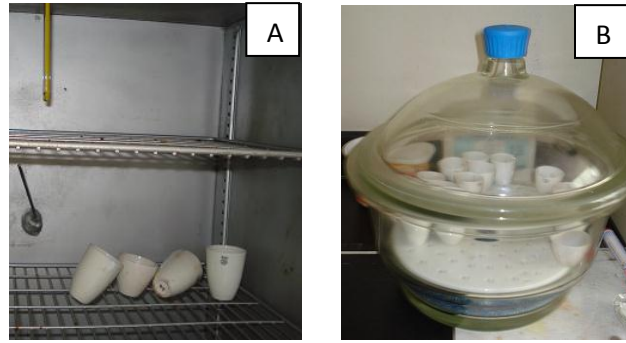


**Figura 2.18** Hidrólisis básica de muestras A) Adición de hidróxido de sodio a la muestra B) filtración de las muestras (Freire, 20120).

#### 2.5.9.5 Determinación de cenizas

Para determinar el contenido de ceniza en el Raygrass, se calentó previamente los crisoles a 130°C. Se los dejó en el desecador hasta que alcanzaron la temperatura ambiente. Se procedió a pesar en los crisoles 1 g de muestra bien homogenizada (Montero, 2008).

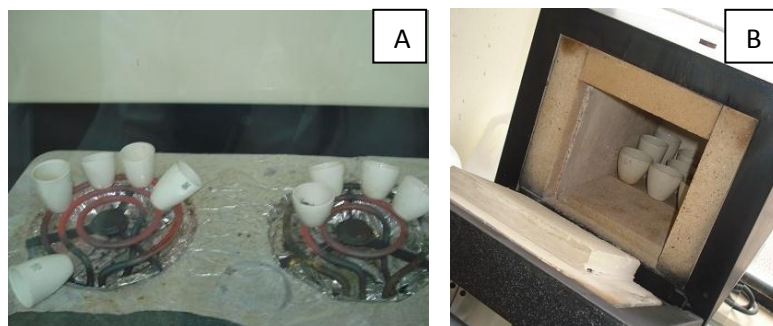




**Figura 2.19** A) Cápsulas con muestras de Raygrass en la estufa B) cápsulas en el desecador (Freire, 2012).

Posteriormente se quemó la muestra en una cocineta, hasta que se observó la completa ausencia de humo. Con la ayuda de pinzas, se trasladaron los crisoles que contenían la muestra a la mufla EFQ-24. Se tomó un tiempo de 4 horas desde que la mufla alcanzó los 550°C (Montero, 2008).

Cuando terminó el tiempo de calcinación, se apagó la mufla y se la dejó enfriar por media hora. Posteriormente se sacaron los crisoles con pinzas y se los transfirió al desecador hasta que alcanzaron la temperatura ambiente. Se retiró los crisoles del desecador y se registró su peso (Montero, 2008).



**Figura 2.20** A) Quemado de las muestras B) Muestras ingresadas en la mufla (Freire, 2012).

## **2.6 Análisis de datos**

### **2.6.1 Variables morfoagronómicas**

Para el análisis de los datos obtenidos de la altura de la planta y longitud de la raíz principal, se utilizó el software estadístico Infostat con el cual se realizó el análisis de varianza y las pruebas de significancia de LSD Fisher (Gutierrez & de la Vara, 2008).

Para la evaluación del índice de cobertura del Raygrass se designó un valor en porcentaje de acuerdo al volumen de germinación en maceta y se valoró de acuerdo a la escala de cobertura de pastos INIAP. Los datos recogidos se analizaron con el software estadístico Infostat con el cual se realizó ANOVA y la prueba LSD Fisher (Gutierrez, 2008).

### **2.6.2 Sobrevivencia de consorcios de cianobacterias**

La evaluación de sobrevivencia de los consorcios de cianobacterias se realizó mediante un análisis visual que consistió en observar la presencia o ausencia de crecimiento de consorcio de cianobacterias sobre medio BG11-0 sólido a partir de la inoculación de las muestras de sustrato y hojas de Raygrass sometidas a los tratamientos fertilizantes con dichos consorcios (Peinador, 1999).

### **2.6.3 Análisis de las variables morfoagronómicas**

Con las variables materia seca, humedad, ceniza, fibra, proteína y grasa se realizó un análisis de varianza y pruebas de significancia de LSD Fisher, con ayuda del programa estadístico Infostat.



## CAPÍTULO 3: RESULTADOS

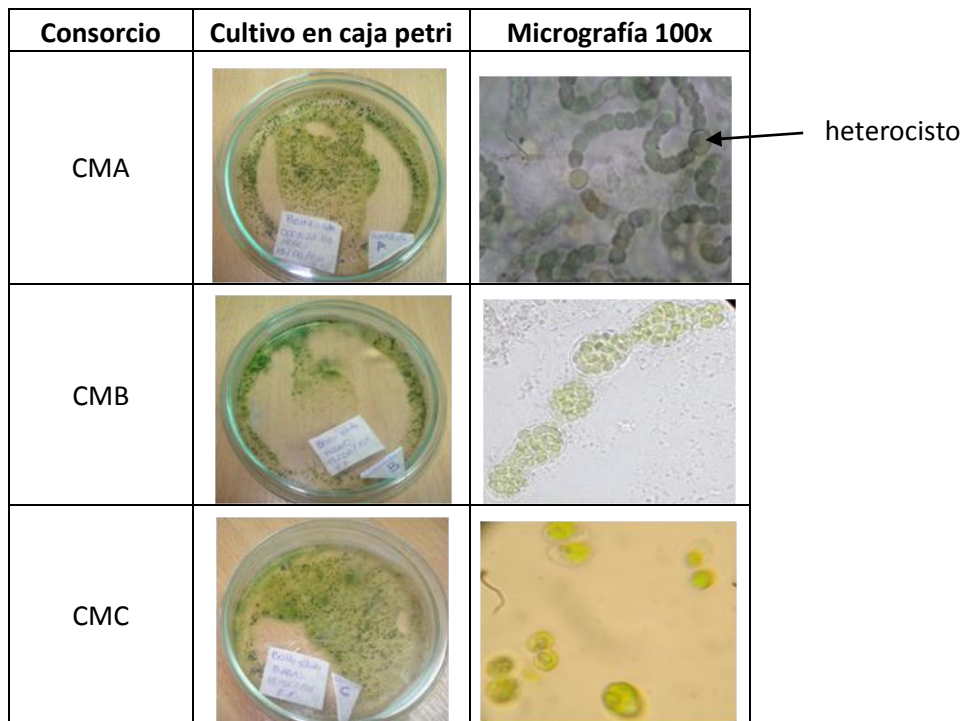
### 3.1 Consorcios microbianos con cianobacterias

Como se observa en la figura 3.1, se obtuvo crecimiento de consorcios microbianos con cianobacterias a partir de los 20 días de la inoculación de muestras en caja petri con medio BG-11o sólido. Se observó que la siembra de las muestras de: corteza de árbol, biofilmes sobre rocas y agregados babosos sobre laderas, presentaron un buen crecimiento por lo que fueron seleccionadas para usarse en la investigación.



**Figura 3.1** Crecimiento de consorcios de cianobacterias a partir de muestras recolectadas en campo (Freire, 2012).

En la figura 3.2, se puede observar el cultivo de cada uno de los tres consorcios que fueron seleccionados por mejor crecimiento en caja petri y sus respectivas micrografías (100x). Los consorcio microbiano obtenidos ( $CM_A$ ,  $CM_B$ ,  $CM_C$ ), estuvieron compuestos de al menos una cianobacteria, junto a microorganismos gran negativos y otros microorganismos no caracterizados. Principalmente en el consorcio microbiano A ( $CM_A$ ), se pudo identificar cianobacterias con células heterocísticas, propias de las cianobacterias fijadoras de nitrógeno (Flores & Herrero, 2009).



**Figura 3.2** Consorcios microbianos con cianobacterias observados al microscopio con aumento de 100X (Freire, 2012).

### 3.2 Análisis de variables morfoagronómicas del Raygrass

Los resultados del análisis del efecto de los tratamientos biofertilizantes sobre las variables morfoagronómicas del Raygrass se describen a continuación:

#### 3.2.1 Medición de altura de planta de Raygrass

Como se muestra en la tabla 3.1, existió diferencia estadística significativa para la variable altura, debido al efecto de cada tratamiento fertilizante. Las medias de los tratamiento resultaron diferentes como lo expresa un  $P= 0,0001$ .

**Tabla 3.1** Análisis de varianza para la variable altura

Fuente de Variabilidad	Suma de cuadrados	G.L	Cuadrado de la Media	F- Valor	P-valor
Modelo	145,99	6	24,33	8,25	0,0001
TRATAMIENTO	145,99	6	24,33	8,25	0,0001
Error	73,77	25	2,95		
Total	219,76	31			

Debido a que existió diferencia significativa entre tratamientos, se realizó el análisis LSD Fisher. Se encontró que los tratamientos: consorcio microbiano con cianobacterias A ( $CM_A$ ), consorcio microbiano con cianobacterias B ( $CM_B$ ) y preparado de Gallinaza (TBG), tuvieron los mejores promedios para la variable altura, por tanto se sitúan en el primer rango de significancia como lo indica la tabla 3.2.

**Tabla 3.2** Prueba LSD de Fisher para la variable altura

Tratamiento	Medias	Rango de significancia				
CMA	23,16	A				
CMB	21,18	A	B			
TBG	21,04	A	B	C		
TQ	19,32		B	C	D	
CMC	18,86			C	D	
TBV	17,54				D	E
TB	15,25					E
Alfa=0,05 DMS=2,38886						
Error: 2,9508 gl: 25						

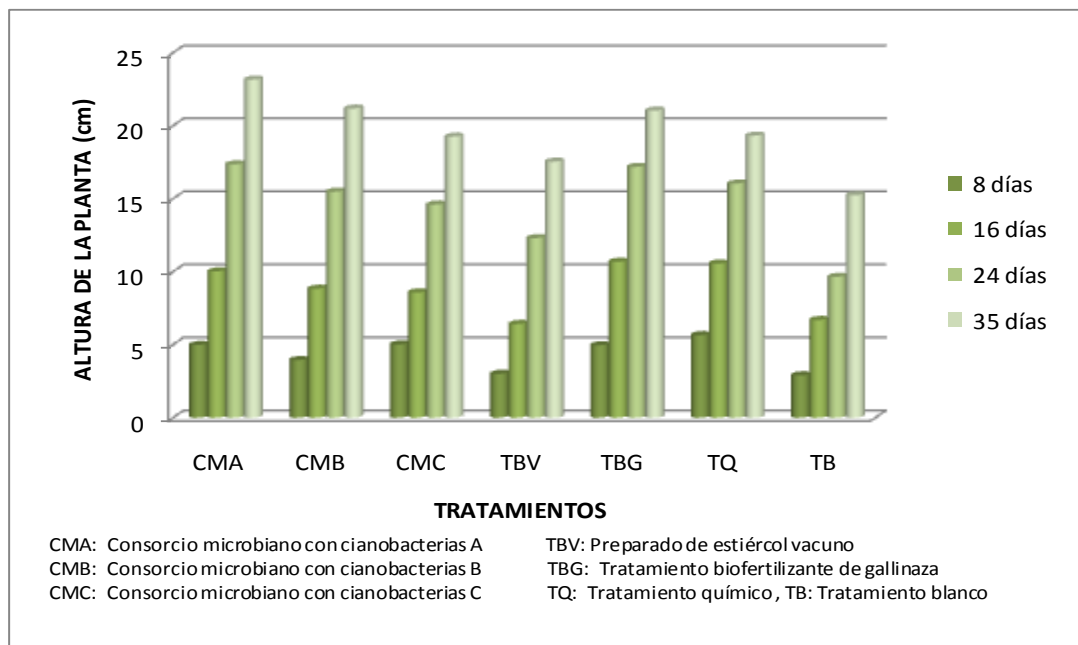
Los resultados obtenidos del promedio de las cuatro observaciones realizadas de la altura de la planta de Raygrass se muestran en la tabla 3.3. Se observa que el mejor promedio de altura alcanzado a los 35 días de germinación, fue en las plantas tratadas con consorcios microbianos con cianobacterias ( $CM_A$ ), con un valor de 23,16 cm de altura.

En la tabla 3.3 se muestran los resultados obtenidos del promedio de las cinco repeticiones de las observaciones (8, 16, 24 y 35 días), realizadas de la altura de las plantas de Raygrass.

**Tabla 3.3** Altura de la planta de Raygrass en cuatro observaciones

OBSERVACIONES	ALTURA DE LA PLANTA (cm)							
	DIAS	CMA	CMB	CMC	TBV	TBG	TQ	TB
8		4,98	3,94	5,02	3,00	4,96	5,66	2,90
16		10,02	8,84	8,58	6,42	10,68	10,56	6,70
24		17,36	15,48	14,60	12,30	17,18	16,04	9,65
35		23,16	21,18	19,26	17,54	21,04	19,32	15,25

La variabilidad de la altura de las plantas respecto a cada tratamiento fertilizante y un blanco (agua destilada) se muestra en la figura 3.3. Se observa que las plantas tratadas con el consorcio microbiano con cianobacterias (CMA) alcanzaron la mejor altura, seguido por el tratamiento con cianobacterias (CMB) y el preparado de estiércol vacuno (TBV).



**Figura 3.3** Variabilidad del promedio de la altura de las plantas de Raygrass (Freire, 2012).

### 3.2.2 Porcentaje de cobertura del Raygrass en las macetas

Para la variable índice de cobertura, la tabla 3.4 muestra que existió diferencia estadística significativa entre los tratamientos investigados, como lo expresa el valor  $P < 0,0001$ . Por tanto la influencia de los tratamientos fertilizantes sobre el índice de cobertura en maceta resultó ser diferente.

**Tabla 3.4** Análisis de varianza para la variable cobertura

Fuente de Variabilidad	Suma de cuadrados	G.L	Cuadrado de la Media	F- Valor	P-valor
Modelo	2095,68	6	349,28	12,18	<0,0001
TRATAMIENTO	2095,68	6	349,28	12,18	<0,0001
Error	717,2	25	28,69		
Total	2812,88	31			

Debido a que existió diferencia significativa entre tratamientos, se realizó el análisis LSD Fisher. Se encontró que el consorcio microbiano con cianobacterias B ( $CM_B$ ), el consorcio microbiano con cianobacterias A ( $CM_A$ ) y el tratamiento biofertilizante gallinaza (TBG) fueron los tratamientos con los mejores promedios para la variable cobertura. Como los indica la tabla 3.5, los tratamientos  $CM_A$ ,  $CM_B$  y TBG se sitúan en el primer rango de significancia frente a los demás tratamientos.

**Tabla 3.5** Prueba LSD Fisher para la variable cobertura

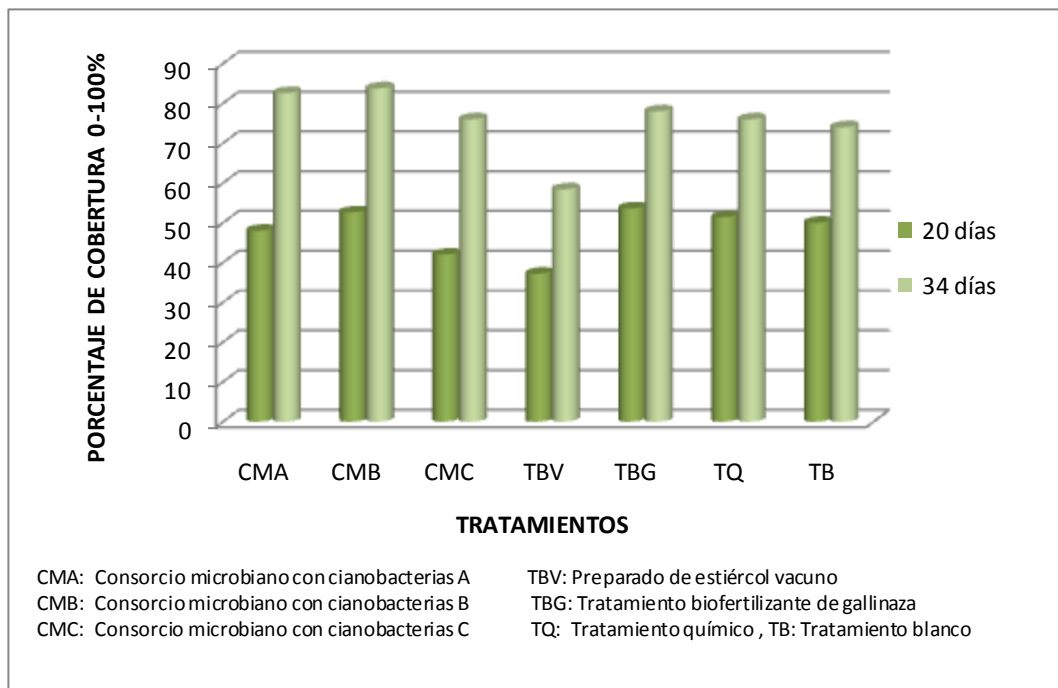
Tratamiento	Medias	Rango de significancia		
CMB	83,8	A		
CMA	82,6	A	B	
TBG	78,0	A	B	
TQ	76,0		B	
CMC	76,0		B	
TB	74,0		B	
TBV	58,4			C
Alfa=0,05 DMS=7,44859				
Error: 28,6880 gl: 25				

En la tabla 3.6 se muestran los porcentajes de cobertura recopilados del promedio de las cinco repeticiones, de las observaciones realizadas a los 20 y 34 días de germinación del Raygrass. Se observa que el mejor porcentaje fue el de las plantas tratadas con consorcios microbianos con cianobacterias (CM<sub>B</sub>), con un valor de 83,8 % de cobertura.

**Tabla 3.6** Porcentaje de cobertura del Raygrass en masetas

OBSERVACIONES	PORCENTAJE DE COBERTURA							
	DIAS	CMA	CMB	CMC	TBV	TBG	TQ	TB
20		48,0	52,6	42,0	37,2	53,6	51,4	50,0
34		82,6	83,8	76,0	58,4	78,0	76,0	74,0

La figura 3.4 indica una buena versatilidad de cobertura en todos los tratamientos. Sin embargo, la mejor cobertura del Raygrass se consiguió con el tratamiento: consorcio microbiano con cianobacterias B (CM<sub>B</sub>), mientras que el fertilizante que mostró menor cobertura fue el preparado de estiércol vacuno (TBV).



**Figura 3.4** Variabilidad del promedio del índice de cobertura de Raygrass en masetas (Freire, 2012).

### 3.2.3 Longitud de la raíz principal de las plantas de Raygrass

En la tabla 3.7 de análisis de varianza se puede observar que hubo diferencia estadística significativa de los tratamientos fertilizantes sobre la variable longitud de raíz, como lo expresa un P de 0,0097.

Es decir los tratamientos fertilizantes mostraron diferente influencia sobre la longitud de la raíz.

**Tabla 3.7** Análisis de varianza para la variable longitud de raíz

Fuente de Variabilidad	Suma de cuadrados	G.L	Cuadrado de la Media	F- Valor	P-valor
Modelo	18,95	6	3,16	3,65	0,0097
TRATAMIENTO	18,95	6	3,16	3,65	0,0097
Error	21,65	25	0,87		
Total	40,60	31			

Debido a que existió diferencia significativa entre los tratamientos, se realizó el análisis LSD Fisher. Se encontró que los tratamientos: consorcio microbiano con cianobacterias B ( $CM_B$ ), consorcio microbiano con cianobacterias A ( $CM_A$ ), tratamiento químico (TQ), consorcio microbiano con cianobacterias C ( $CM_C$ ) y el tratamiento blanco (TB), mostraron los mejores resultados en cuanto a la variable longitud de la raíz.

Como lo indica la tabla 3.8 CMB, CMA, TQ, CMC, TB, en dicho orden tuvieron los mejores promedios respecto a la longitud de la raíz de la planta. Por tanto se sitúan en el primer rango de significancia, respecto a los demás tratamientos empleados en la investigación.

**Tabla 3.8** Prueba LSD Fisher para la variable longitud de raíz

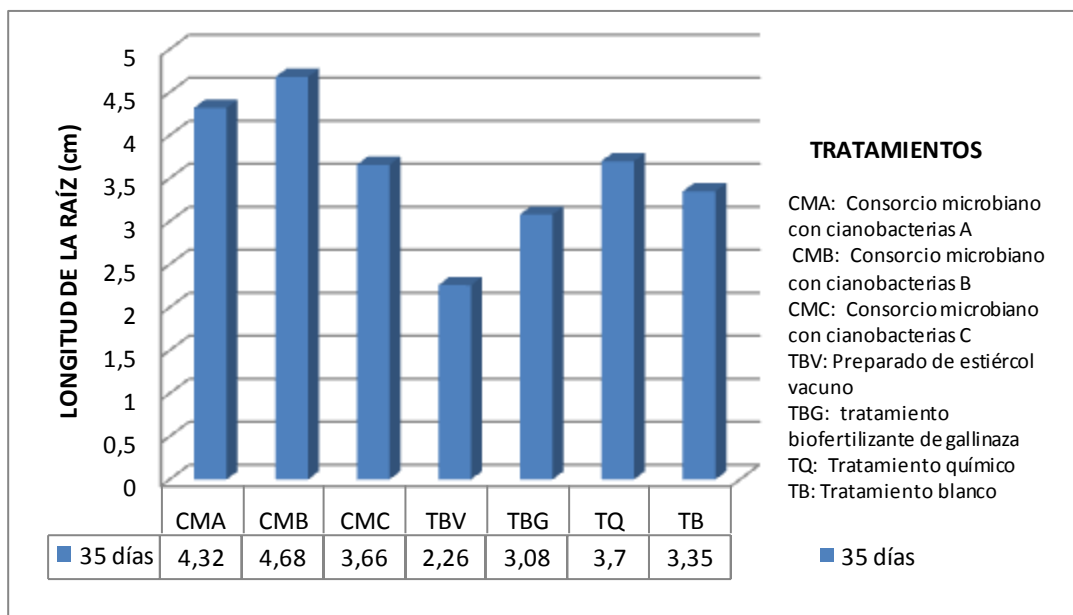
Tratamiento	Medias	Rango de significancia		
CMB	4,68	A		
CMA	4,32	A		
TQ	3,70	A	B	
CMC	3,66	A	B	
TB	3,35	A	B	C
TBG	3,08		B	C
TBV	2,26			C
Alfa=0,05 DMS=1,29424				
Error: 0,8661 gl: 25				

Las plantas de Raygrass que fueron tratadas con el biofertilizante: consorcio microbiano con cianobacterias B (CM<sub>B</sub>), mostraron un mejor crecimiento del sistema radicular.

Como se muestra en la figura 3.5, las plantas en las que se aplicó el tratamiento CM<sub>B</sub>, indicaron en promedio una longitud de la raíz principal de 4.68 cm, superando a los datos de longitud de la raíz obtenidos con los demás tratamientos.

En las plantas que se aplicó el tratamiento estiércol vacuno (TBV), se evidencia una menor longitud de la raíz con 2.26 cm, a los 35 días de realizada la evaluación.




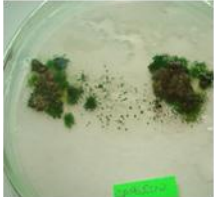


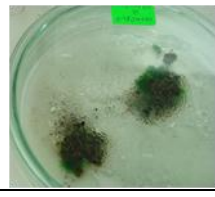



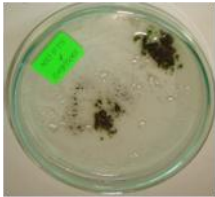
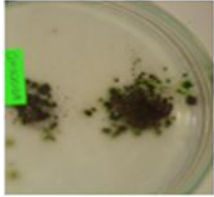

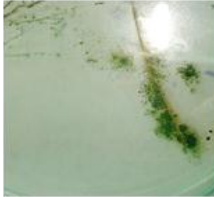


**Figura 3.5** Variabilidad del promedio de la longitud de la raíz de la planta de Raygrass (Freire, 20120).

### 3.3 Análisis de sobrevivencia de cianobacterias

Como se muestra en la figura 3.6, la sobrevivencia de consorcios microbianos con cianobacterias ( $CM_A$ ,  $CM_B$  y  $CM_C$ ), resultó exitosa en las muestras de sustrato y hojas de Raygrass.

La sobrevivencia de los consorcios aplicados al sustrato y hojas se hizo evidente aproximadamente a los 15 días, tiempo normalmente requerido para el crecimiento de las cianobacterias en BG11<sub>0</sub> en el laboratorio. Se evidenció la sobrevivencia, con el crecimiento de las cepas de consorcios microbianos con cianobacterias alrededor de las muestras incubas. Al finalizar los 30 días de la evaluación (figura 3.6), se observó un incremento en el crecimiento de los consorcios microbianos alrededor de las muestras.

MUESTRA	EVALUACIÓN EN EL SUSTRATO		EVALUACIÓN EN LAS HOJAS	
	15 días	30 días	15 días	30 días
CMA				
CMB				
CMC				

**Figura 3.6** Evaluación de la sobrevivencia de consorcios de cianobacterias tanto en sustratos como en hojas (Freire, 2012).

### 3.4 Análisis de variables nutricionales

Las variables nutricionales analizadas estadísticamente fueron: porcentaje de materia seca, humedad, proteína, grasa, fibra y ceniza.

#### 3.4.1 Porcentaje de materia seca del Raygrass

Como se muestra en la tabla 3.9, existió diferencia estadística significativa para la variable materia seca. Las medias de los tratamientos fueron diferentes, como lo corrobora el valor  $P < 0,0001$ . Por lo tanto, la influencia de los fertilizantes sobre el porcentaje de materia seca del Raygrass resultó ser diferente.

**Tabla 3.9** Análisis de varianza para la variable materia seca

Fuente de Variabilidad	Suma de cuadrados	G.L	Cuadrado de la Media	F- Valor	P-valor
Modelo	10,35	5	2,07	74,11	<0,0001
TRATAMIENTO	10,35	5	2,07	74,11	<0,0001
Error	0,34	12	0,03		
Total	10,69	17			

Debido a que existió diferencia significativa entre tratamientos, se realizó el análisis LSD Fisher. Se encontró que el tratamiento químico (TQ), el tratamiento biofertilizante gallinaza (TBG) y el preparado de estiércol vacuno (TBV) fueron los tratamientos con los mejores promedios para la variable materia seca. Como los indica la tabla 3.10 los tratamientos TQ, TBG y TBV se sitúan en el primer rango de significancia frente a los demás tratamientos.

**Tabla 3.10** Prueba LSD Fisher para la variable materia seca

Tratamiento	Medias	Rango de significancia		
TQ	23,96	A		
TBG	23,89	A		
TBV	23,78	A		
CMB	23,33		B	
CMA	23,27		B	
CMC	21,74			C
Alfa=0,05 DMS=0,29735 Error: 0,0279 gl: 12				

### 3.4.2 Porcentaje de humedad del Raygrass

Para la variable humedad, como se muestra en la tabla 3.11 de análisis de varianza, entre los tratamientos existió diferencia significativa, corroborado por un valor P <0,0001. Es así que la humedad del Raygrass resultó ser diferente en cada tratamiento.

**Tabla 3.11** Análisis de varianza para la variable humedad

Fuente de Variabilidad	Suma de cuadrados	G.L	Cuadrado de la Media	F- Valor	P-valor
Modelo	10,35	5	2,07	74,11	<0,0001
TRATAMIENTO	10,35	5	2,07	74,11	<0,0001
Error	0,34	12	0,03		
Total	10,69	17			

Debido a que existió diferencia significativa entre tratamientos, se realizó el análisis LSD Fisher. Como lo indica la tabla 3.12, se encontró que el tratamiento consorcio microbiano con cianobacterias C (CM<sub>C</sub>), mostró el mejor resultado en cuanto a la variable porcentaje de humedad, por tanto se sitúan en el primer rango de significancia, respecto a los demás tratamientos empleados en la investigación.

**Tabla 3.12** Prueba LSD Fisher para la variable humedad

Tratamiento	Medias	Rango de significancia		
CMC	79,73	A		
CMA	79,26		B	
CMB	77,67		B	
TBV	76,22			C
TBG	76,11			C
TQ	76,04			C
Alfa=0,05 DMS=0,29735 Error: 0,0279 gl: 12				

### 3.4.3 Porcentaje de proteína del Raygrass

En la tabla 3.13 de análisis de varianza, se puede observar que hubo diferencia estadística significativa de los tratamientos fertilizantes sobre el porcentaje de proteína, como lo expresa un P <0,0001.

Los tratamientos fertilizantes mostraron diferente influencia sobre la el porcentaje de proteína del Raygrass.

**Tabla 3.13** Análisis de varianza para la variable proteína

Fuente de Variabilidad	Suma de cuadrados	G.L	Cuadrado de la Media	F- Valor	P-valor
Modelo	421,22	5	84,24	189548,56	<0,0001
TRATAMIENTO	421,22	5	84,24	189548,56	<0,0001
Error	0,01	12	4,40E-04		
Total	421,22	17			

Debido a que existió diferencia significativa entre los tratamientos, se realizó el análisis LSD Fisher. Se encontró que los tratamientos: biofertilizante vacuno (TBV) y consorcio microbiano con cianobacterias A (CM<sub>A</sub>), mostraron los mejores resultados en cuanto al porcentaje de proteína del Raygrass.

Como lo indica la tabla 3.14, los biofertilizantes TBV y CMA tuvieron los mejores promedios de porcentaje de proteína, por lo que se sitúan en el primer rango de significancia, respecto a los demás tratamientos empleados en la investigación.

**Tabla 3.14** Prueba LSD Fisher para la variable proteína

Tratamiento	Medias	Rango de significancia				
TBV	11,75	A				
CMA	11,74	A				
CMB	11,07		B			
TBG	2,74			C		
CMC	1,73				D	
TQ	1,22					E
Alfa=0,05 DMS=0,03750						
Error: 0,0004 gl: 12						

### 3.4.4 Porcentaje de grasa del Raygrass

Como se indica en la tabla 3.15, de acuerdo al análisis de varianza, existió diferencia estadística significativa para la variable grasa. Las medias de los tratamientos resultaron diferentes, como lo corrobora el valor  $P < 0,0001$ , por lo tanto, la influencia de los fertilizantes sobre el porcentaje de grasa del Raygrass resultó ser diferente.

**Tabla 3.15** Análisis de varianza para la variable grasa

Fuente de Variabilidad	Suma de cuadrados	G.L	Cuadrado de la Media	F- Valor	P-valor
Modelo	0,15	5	0,03	23,39	<0,0001
TRATAMIENTO	0,15	5	0,03	23,39	<0,0001
Error	0,02	12	1,30E-03		
Total	0,16	17			

Los resultados del análisis LSD Fisher mostrados en la tabla 3.16, indican que el mejor porcentaje de grasa, se obtuvo de las muestras tratadas con el biofertilizante preparado a base de estiércol de vaca (TBV) con valores de 0,42% de grasa, con lo que se lo sitúa en el primer rango de significancia.

**Tabla 3.16** Prueba LSD Fisher para la variable grasa

Tratamiento	Medias	Rango de significancia		
TBV	0,42	A		
TBG	0,26		B	
CMA	0,26		B	
CMB	0,22		B	
CMC	0,22		B	
TQ	0,12			C
Alfa=0,05 DMS=0,06359 Error: 0,0013 gl: 12				

### 3.4.5 Porcentaje de fibra del Raygrass

En la tabla 3.17 de análisis de varianza para la variable fibra, se muestra que existió diferencia estadística significativa entre los tratamientos. El valor  $P < 0.0001$ , indicó que al menos uno de los tratamientos fertilizantes influyó de forma diferente sobre el contenido de fibra del Raygrass.

**Tabla 3.17** Análisis de varianza para la variable fibra

Fuente de Variabilidad	Suma de cuadrados	G.L	Cuadrado de la Media	F- Valor	P-valor
Modelo	4,85	5	0,97	247,85	<0,0001
TRATAMIENTO	4,85	5	0,97	247,85	<0,0001
Error	0,05	12	3,90E-03		
Total	4,9	17			

Debido a que existió diferencia significativa entre los tratamientos, se realizó el análisis LSD Fisher. Se encontró que el tratamiento biofertilizante gallinaza (TBG), mostró los mejores resultados en cuanto al porcentaje de fibra de las muestras de Raygrass. Como se indica en la tabla 3.18, el biofertilizante TBG muestra el mejor promedio respecto a los demás tratamientos, por lo tanto se ubica en el primer rango de significancia.

**Tabla 3.18** Prueba LSD Fisher para la variable fibra

Tratamiento	Medias	Rango de significancia			
TBG	4,57	A			
CMC	4,08		B		
CMA	3,45			C	
TBV	3,24				D
CMB	3,24				D
TQ	3,17				D
Alfa=0,05 DMS=0,11134					
Error: 0,0039 gl: 12					

### 3.4.6 Porcentaje de ceniza del Raygrass

En la tabla 3.19 de análisis de varianza se puede observar que hubo diferencia estadística significativa de los tratamientos fertilizantes sobre la variable porcentaje de ceniza. El valor  $P < 0,0001$  demuestra que los tratamientos fertilizantes indicaron diferente influencia sobre el porcentaje de ceniza del Raygrass.

**Tabla 3.19** Análisis de varianza para la variable ceniza

Fuente de Variabilidad	Suma de cuadrados	G.L	Cuadrado de la Media	F- Valor	P-valor
Modelo	1,31	5	0,26	491,4	<0,0001
TRATAMIENTO	1,31	5	0,26	491,4	<0,0001
Error	0,01	12	5,30E-04		
Total	1,32	17			

Como se muestra en la tabla 3.20, el análisis LSD de Fisher mostró que los tratamientos: químico (TQ), el consorcio microbiano con cianobacterias B ( $CM_B$ ) y el preparado a base de estiércol vacuno (TBV) tuvieron los mejores resultados de porcentaje de ceniza en el Raygrass. Los tratamientos TQ,  $CM_B$  Y TBV muestran los mejores promedios por lo que se ubican en el primer rango de significancia.

**Tabla 3.20** Prueba LSD Fisher para la variable ceniza

Tratamiento	Medias	Rango de significancia			
TQ	7,89	A			
CMB	7,88	A			
TBV	7,88	A			
CMA	7,76		B		
CMC	7,59			C	
TBG	7,13				D
Alfa=0,05 DMS=0,04108 Error: 0,0005 gl: 12					



En la tabla 3.21, se muestran los resultados de los porcentajes nutricionales de las plantas de Raygrass, tratadas con los fertilizantes: consorcio microbiano con cianobacterias A ( $CM_A$ ), consorcio microbiano con cianobacterias B ( $CM_B$ ), consorcio microbiano con cianobacterias ( $CM_C$ ), biofertilizante a base de estiércol vacuno (TBV), biofertilizante gallinaza (TBG) y el tratamiento químico (TQ).

**Tabla 3.21** Porcentajes nutricionales del Raygrass

	<b>CMA</b>	<b>CMB</b>	<b>CMC</b>	<b>TBV</b>	<b>TBG</b>	<b>TQ</b>
<b>M. SECA</b>	23,27	22,33	21,74	23,78	23,89	22,69
<b>HUMEDAD</b>	76,73	76,67	78,26	76,22	76,11	76,04
<b>PROTEINA</b>	11,74	11,07	1,73	11,75	2,74	1,22
<b>GRASA</b>	0,26	0,22	0,22	0,42	0,26	0,12
<b>FIBRA</b>	3,45	3,24	4,08	3,24	4,57	3,17
<b>CENIZA</b>	7,76	7,88	7,59	7,88	7,13	7,89

En la figura 3.7, se muestra la variabilidad de los porcentajes nutricionales del Raygrass, respecto a cada tratamiento fertilizante empleado en la investigación.

Como se indica en la figura 3.7, los tratamientos biofertilizantes que consistieron de consorcios microbianos con cianobacterias ( $CM_C$ ,  $CM_A$ ,  $CM_B$ ), presentaron los porcentajes de humedad más altos, con 78.26%, 76.73% y 76.67% respectivamente.

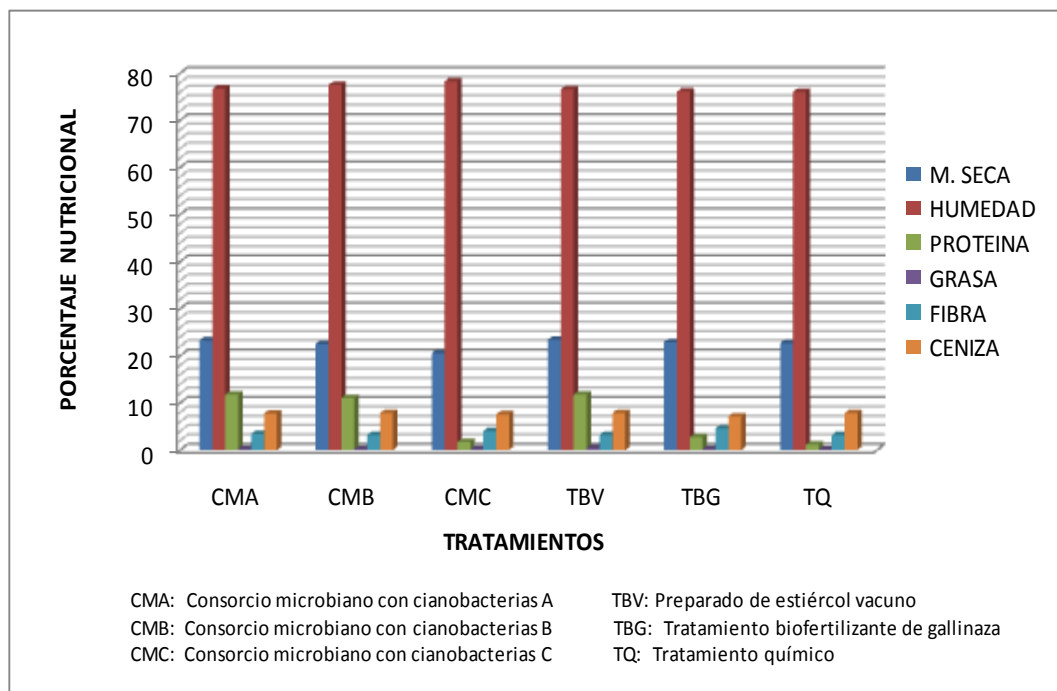
En cuanto a la variable proteína, las muestras de Raygrass que fueron tratadas con  $CM_A$  y TBV tuvieron los porcentajes más altos de contenido proteico con valores de 11.74% y 11.75% respectivamente.

Referente al porcentaje de grasa, se puede observar que los valores fueron bajos para todas las muestras analizadas, sin embargo las muestras

de Raygrass que fueron tratadas con el preparado de estiércol vacuno (TBV) mostraron el mayor contenido de grasa con el 0,42%.

Respecto a los valores de fibra, se puede observar que los tratamientos con mayores porcentajes resultaron ser: el preparado de gallinaza (TBG) con 4,57% de fibra y el preparado de estiércol vacuno (TBV) con 4,08%.

Para la variable ceniza, se observaron valores similares entre todas las muestras. Sin embargo, el mayor contenido de ceniza estuvo dado por las muestras tratadas con TQ con 7.89% de ceniza.



**Figura 3.7** Variabilidad de los porcentajes nutricionales del Raygrass (Freire, 2012).

## CAPÍTULO 4: DISCUSIÓN

### 4.1 Análisis de la influencia de los biofertilizantes en las variables morfoagronómicas evaluadas del Raygrass

El análisis de la altura de las plantas de Raygrass tratadas con diferentes fertilizantes, dió como resultado diferencias estadísticas significativas entre los tratamientos. La aplicación de consorcios microbianos con cianobacterias ( $CM_A$ ,  $CM_B$ ) y el tratamiento biofertilizante gallinaza (TBG) mostraron una mayor influencia sobre el crecimiento de las plántulas de Raygrass. Las plantas en las que se aplicó los tratamientos  $CM_A$ ,  $CM_B$  y TBG mostraron mejores alturas respecto a las plantas tratadas con los otros biofertilizantes.

El éxito de los tratamientos  $CM_A$ ,  $CM_B$  sobre la variable altura de la planta, se puede atribuir a los consorcios microbianos de los biofertilizantes. Según Lerner (1999), la presencia de cianobacterias en consorcio, aplicadas a las plantas de forma foliar o en el suelo, promueven su crecimiento morfoagronómico. La capacidad de actuar como biofertilizante está dada, por su contenido de bioantioxidantes y activadores (polifenoles, carotenoides, enzimas), por sus fitohormonas y regulares de crecimiento (citoquininas, oligosacáridos y bataínas). Pero sin duda, una de las propiedades más importantes e influyentes en el desarrollo de las plantas es la fijación biológica de nitrógeno, en la cantidad necesaria y suficiente (Parés & Juárez, 1997; Lerner, 1999).

El nitrógeno es un factor limitante en el crecimiento de las plantas puesto que en concentraciones bajas no permite que la planta alcance mayores alturas. Por otro lado, si se abastece en exceso de nitrógeno a la planta, se le ocasiona una inhibición a su normal desarrollo. Con la finalidad

de controlar este factor, se realizaron ensayos previos en los que se aplicó varios volúmenes de cianobacterias en una concentración de  $5,01 \times 10^7$  cel.mL<sup>-1</sup>. El volumen de 40 mL presentó los mejores resultados, por lo que fue usado en el diseño experimental de la tesis. Determinar la concentración celular de los consorcios de cianobacterias, también fue clave para la investigación ya que se requería que las células se encuentren en fase exponencial. Según Soletto *et al.*, (2006) se inocula cianobacterias como tratamiento, en fase exponencial ya que es un periodo caracterizado por la duplicación celular. Si el crecimiento no se ve limitado, la duplicación continúa a un ritmo constante, con lo que el número de células y la tasa de crecimiento de la población se incrementan con cada periodo de tiempo consecutivo. Es necesario mantener las células en su etapa metabólica óptima, cuando se transfiere las cianobacterias a un nuevo sustrato, pues las nuevas células requerirán de una adaptación previa, antes de continuar con su ciclo de crecimiento.

Los mejores resultados de altura, obtenidos de las muestras tratadas con el consorcio microbiano con cianobacterias (CM<sub>A</sub>), se atribuye a que dicho consorcio se caracterizó por presentar cianobacterias con heterocistos como se indicó en la figura 3.2, comparadas con las de los otros dos consorcios donde se observó otro tipo de cianobacterias. Según Capone *et al.*, (1997) los heterocistos son células especializadas, en las que se localiza exclusivamente la nitrogenasa, y donde no hay liberación de oxígeno, existiendo una separación especial entre la fijación de nitrógeno y la fotosíntesis.

En la fotosíntesis, las células fijan dióxido de carbono, que es distribuido hacia las células vegetativas y otra parte hacia el sustrato. Durante este proceso se genera oxígeno que es utilizado por la planta para el proceso de respiración celular (Graham & Wilcox, 2000). Por otra parte, el nitrógeno fijado en formas asimilables es empleado para sintetizar

aminoácidos, proteínas y otros compuestos nitrogenados y lo demás se deposita en el ambiente en el que se desarrollan las plantas para ser aprovechado por otros microorganismos que conviven en consorcio con las cianobacterias (Párez & Juárez, 1997; Lerner, 1999).

En cuanto a la variable cobertura del Raygrass en maceta, se encontró diferencia estadística significativa entre los seis tratamientos fertilizantes empleados. Las muestras de Raygrass que mostraron los mejores índices de cobertura fueron las tratadas con consorcios microbianos con cianobacterias (CM<sub>B</sub>, CM<sub>A</sub>) y el biofertilizante gallinaza (TBG) con valores de 78 al 83% de cobertura, que según la escala del INIAP son considerados como porcentajes buenos a muy buenos.

Los buenos índices de cobertura obtenidos de la aplicación de los consorcios microbianos con cianobacterias se deben a que estos microorganismos tiene la capacidad de promover el crecimiento vegetativo. Las cianobacterias fijan y producen macronutrientes como nitrógeno, potasio, calcio, magnesio, fósforo y oligoelementos, sintetizan polisacáridos matriciales como alginatos y polisacárido de reserva como manitol, sustancias que en conjunto estimulan el desarrollo de las plantas. Se ha demostrado que estos diazotróficos también producen repelentes como compuestos aromáticos y terpenoides halogenados, que controlan las plagas (hongos, bacterias, insectos, nemátodos), que pudieran interferir en el normal desarrollo de las plantas (Abertz 2000; Bailey *et al.*, 1993; Bernal, 2008; Norrie, 2000).

Respecto al análisis de la variable longitud de la raíz, se encontró que existió diferencia estadística significativa entre los tratamientos aplicados al Raygrass. Se obtuvo los mejores resultados con la aplicación del biofertilizante consorcio microbiano con cianobacterias B (CM<sub>B</sub>). El desarrollo de las raíces, puede atribuirse al contenido de hormonas

(fundamentalmente citoquininas) propios de las cianobacterias. Está demostrado científicamente (Crouch & Standen, 1993; Meeting *et al.*, 1988; Zhang *et al.*, 1991) la presencia de al menos seis tipos de citoquininas y precursores en cianobacterias. Las citoquininas actúan como bioestimulantes que activan el crecimiento y desarrollo radicular.

Globalmente, el desarrollo morfoagronómico del Raygrass se relaciona con el estado fenológico de la planta. Cuando las pasturas se encuentran en estado vegetativo la acción de factores externos como temperatura, agua, luz natural o artificial y fertilización así como la acción de factores internos como las fitohormonas y reguladores de crecimiento, participan en conjunto en el desarrollo de las plantas (Bernal, 2008; Norrie, 2000).

#### **4.2 Análisis de la sobrevivencia de consorcios microbianos con cianobacterias**

Durante el análisis de sobrevivencia de los consorcios microbianos con cianobacterias se observó indicios de su crecimiento a los 15 días posteriores a la inoculación de muestras de sustrato y hojas en el medio BG-11<sub>0</sub> sólido. Se comprobó que los consorcios de cianobacterias si tenían la capacidad de sobrevivir después de haber sido aplicados como tratamientos biofertilizante a sustrato y hojas de Raygrass anual sembrado en condiciones de cámara de invernadero.

La capacidad de sobrevivencia que mostraron los consorcios CM<sub>A</sub>, CM<sub>B</sub> y CM<sub>C</sub> tanto en sustrato como en hojas se debe a factores como la habilidad que poseen las cianobacterias para adaptarse y desarrollarse en todo tipo de ambientes, sus estrategias de tolerancia y proliferación en

hábitat como suelos húmedos, troncos muertos, corteza de árboles y otros ambientes extremos (Herrero *et al.*, 2001; Peinador, 1999).

Según Valderra & Téllez (2003) el crecimiento y la proliferación de las cianobacterias también están relacionados con las sustancias alelopáticas. Muchas de estas sustancias son segregadas especialmente cuando crecen en consorcios microbianos puesto que compiten por el medio evitando ser desplazados por otros microorganismos. Dicha propiedad posiblemente puede promover el crecimiento de los consorcios tanto en el sustrato como en las hojas de Raygrass.

En la investigación, el análisis de sobrevivencia fue fundamental para comprobar que los consorcios con cianobacterias eran capaces de sobrevivir después de la aplicación al sustrato y hojas de Raygrass. La adaptabilidad y desarrollo de las cianobacterias en un nuevo sustrato son indispensables para cumplir el rol biológico de fijación de nitrógeno atmosférico y, a su vez, promover la germinación y crecimiento de las plantas de Raygrass (Herrero *et al.*, 2001).

#### **4.3 Análisis de variables nutricionales del Raygrass**

En cuanto a la materia seca, se observó diferencia estadística significativa entre los tratamientos fertilizantes. Las muestras de Raygrass que mostraron mayor contenido de materia seca fueron aquellas tratadas con el fertilizante químico (TQ). Según Tekalign & Hammes (2005), la asimilación de materia seca y su distribución dentro de la planta, son procesos importantes que determinan la productividad de los forrajes. Esta asimilación de nutrientes pudo deberse a que el fertilizante químico estuvo compuesto de elementos (sulfato de potasio, ácido bórico, sulfato de magnesio heptahidratado, cloruro de potasio entre otros) que son fácilmente

asimilables por la planta. Sin embargo, cabe recalcar que los porcentajes de materia seca obtenidos de las muestras que fueron biofertilizadas no se consideran bajos en cuanto a rendimiento de las pasturas, por lo que se supone que las cianobacterias influyen de manera positiva en la asimilación de nutrientes para la posterior formación de materia seca.

Referente a los porcentajes de humedad, los resultados obtenidos mediante el análisis de varianza, denotan que existió diferencia estadística significativa en cuanto a la influencia de los fertilizantes sobre la variable humedad del Raygrass. Las muestras con mayores porcentajes de humedad fueron aquellas tratadas con consorcios microbianos con cianobacterias CM<sub>C</sub>, CM<sub>A</sub> y CM<sub>B</sub>, de las que se reportaron porcentajes de humedad de 78.26%, 76.73%, 76.67% respectivamente. Este alto contenido de humedad se le atribuye a los microorganismos de los consorcios específicamente a las cianobacterias. Según Lobban & Harrison (2004) las cianobacterias poseen ficocoloides (hidrolocoides) que recubren sus paredes celulares. Los ficocoloides tienen la capacidad de formar una red que retiene gran cantidad de agua, lo que les confiere una propiedad reológica única, y explica su actuación como hidratantes de suelo. La gran higroscopicidad de estos coloides les permite captar agua de forma reiterada, con lo que se aumenta y mantiene la capacidad de campo de los suelos. Así mismo, sus propiedades viscosantes – gelificantes permiten crear una fina capa hidratante, tanto sobre el suelo como las hojas de la planta (Povolny, 1991; Lahaye *et al.*, 2009). Por otro lado, esta propiedad de retener agua, también facilita el proceso de fotosíntesis al promover la conductancia estomática (Iglesias & Monteros, 2005; Lerner, 1999).

Según León (2003) la disponibilidad de moléculas de agua, dada por la interacción de las cianobacterias, contribuiría con la regulación de temperatura y equilibrio hídrico de la planta. Se podría decir que los



consorcios con cianobacterias de acuerdo a los resultados obtenidos facilitan la hidratación de las plantas forrajeras evitándoles la pérdida de agua por evaporación (Castro *et al.*, 2002).

Los resultados de porcentaje de proteína evaluados en las muestras de Raygrass, sometidos a diferentes fertilizantes, mostraron diferencia estadística significativa entre ellos. Los porcentajes más altos de proteína fueron obtenidos de las muestras en las que se aplicó estiércol vacuno (TBV) y consorcio microbiano con cianobacterias A (CM<sub>A</sub>). Dichos resultados pueden ser atribuidos a los microorganismos de estos biofertilizantes. Según Domínguez (1999), el nitrógeno provisto por biofertilización, es un constituyente de los más importantes compuestos y complejos órgano minerales de la planta como aminoácidos, proteínas, ácidos nucleicos, amidas y aminas. La clorofila, componente esencial en la fotosíntesis, también es una sustancia nitrogenada. Investigaciones realizadas por Mohamed *et al.* (1997) detectaron aumentos en el contenido de aminoácidos, proteínas y clorofila, en plantas de tomate, cuando inocularon el cultivo con microorganismos diazotróficos.

En cuanto a la variable, porcentaje de grasa, los resultados obtenidos mostraron diferencias estadísticas significativas entre las muestras tratadas con fertilizantes. De las muestras de Raygrass, aquellas tratadas con el preparado de estiércol vacuno (TBV) obtuvieron la mayor concentración de grasa. Los resultados se debieron probablemente a que el tratamiento TBV era un fertilizante preparado a base de estiércol, por lo cual aportó al sustrato con nutrientes como el fósforo, que al ser asimilado por los tejidos meristemáticos de las plantas, contribuyen con la formación de ácidos nucleicos, fosfolípidos y coenzimas NAD y NADP. Según Domínguez (1999), el fósforo provisto mediante biofertilización participa en el proceso de reproducción y en la constitución genética de las plantas por ser un

componente de los ácidos nucleicos. Interviene además en muchas reacciones bioquímicas relacionadas con el metabolismo de los carbohidratos, grasas y proteínas.

La concentración de fibra en los forrajes es otro parámetro importante, puesto que le confiere resistencia a la planta. En cuanto a los resultados obtenidos, en los porcentajes de fibra de las muestras de Raygrass, se observó que hubo diferencia estadística significativa respecto a cada tratamiento. De acuerdo con los análisis, las muestras de Raygrass tratadas con Gallinaza (TBG) indicaron los porcentajes de fibra más altos. Este resultado puede atribuirse a que la Gallinaza es un apreciado fertilizante orgánico, relativamente concentrado y de rápida acción. Contiene todos los nutrientes básicos indispensables para que las plantas puedan sintetizar sus hidratos de carbono. Según Gonzales (2005) los carbohidratos en los vegetales son muy abundantes, generalmente sobrepasan el 75% de la materia seca. Esta abundancia en las plantas se debe a su fácil elaboración mediante el mecanismo de fotosíntesis. Los carbohidratos presentes en las plantas proporcionan energía y fibra. Entre los carbohidratos de bajo peso molecular, como los monosacáridos, se encuentran la Xilosa y Arabinosa que constituyen la cadena principal de la hemicelulosa en los forrajes (Sergio, 2009; Yu, Jia & Dai, 2009).

Respecto al contenido de ceniza, las muestras de Raygrass tratadas con el fertilizante químico mostraron los porcentajes más altos de ceniza. Según León (2003), la ceniza es el residuo inorgánico o fracción mineral, que queda después de quemar la materia orgánica. Los resultados obtenidos pudieron deberse a que el tratamiento químico aportó con elementos inorgánicos que fueron absorbidos del suelo por la planta y posteriormente asimilados en el proceso de fotosíntesis (Montero, 2008; León 2003).

Los biofertilizantes gallinaza y el preparado de estiércol vacuno no influyeron de manera significativa en el desarrollo y valor nutricional del Raygras anual, en comparación con las plántulas que fueron tratadas con consorcios de cianobacterias. Los resultados de las variables morfo agronómicas en las muestras en las que se aplicó gallinaza y el preparado de estiércol vacuno pudieron deberse a las bajas concentraciones de nutrientes y los elevados niveles de humedad presentes en estos abonos. Según Cubero & Vieira, (2001) estas son razones que constituyen una de las debilidades de estos preparados.

Por otro lado, los contenidos de nutrientes en los abonos orgánicos son poco manejables y están en función de sus concentraciones en los residuos utilizados. Por ejemplo, la concentración de fósforo en los residuos de origen orgánico es generalmente baja. En los suelos tropicales pobres en fósforo las necesidades de fertilización con este nutriente van más allá de las cantidades que pueden ser suministradas por un abono orgánico (Espino, 2001). Sin embargo esta desventaja se podría paliar aumentando la eficiencia de adición de fósforo a las plantas de forma químico- biológica.

El contenido y el comportamiento de los abonos orgánicos es muy variable de acuerdo a los materiales que se utilizan para producirlo, además existen muy pocas posibilidades de ejercer un control de su calidad a nivel de finca y a gran escala (Cubero & Vieira, 2001). Por lo que ante dichas desventajas, el empleo de consorcios microbianos con cianobacterias sería una alternativa viable para mantener una productividad competitiva. La facilidad de controlar los cultivos de cianobacterias y utilizar medios inorgánicos sencillos para su masificación, hacen que las cianobacterias empleadas como fertilizantes reduzcan los costos de manejo y productividad de los cultivos (Garbisu, 1999; Anesín et al., 2003).

De forma global, se puede decir que las propiedades de las cianobacterias, entre estas: la capacidad de captar energía lumínica por medio de sus ficobilisomas, el contar con complejos proteicos, la habilidad para adaptar su metabolismo e interactuar con el ambiente, para poder desarrollarse en casi cualquier sustrato, hacen de las cianobacterias microorganismos útiles en la biofertilización de cultivos (Ortega *et al.*, 2004).

Los consorcios de cianobacterias empiezan a tener un rol cada vez más importante en área agrícola. El uso de cianobacterias como biofertilizantes ya sea aisladas o en consorcios, han dado muy buenos resultados en los cultivos en los que han sido evaluados. Debido a la simpleza de su cultivo, las cianobacterias pueden ser cultivadas a grande escala, con la finalidad de desarrollar un proceso industrial rentable. Sin embargo, es necesario profundizar en el estudio de su comportamiento, fisiología, interacciones con el ambiente así como determinar los mejores géneros para ser empleados en la agricultura.

## CAPÍTULO 5: CONCLUSIONES

1. Los tratamientos  $CM_A$  y  $CM_B$  mostraron alturas de 23,16 cm y 21,18 cm respectivamente, valores que superan al control químico del cual se reporto una altura de 19,32 cm.
2. Con la aplicación de  $CM_B$  en el Ryegrass se consiguió una cobertura de 83,8% frente al tratamiento químico que únicamente alcanzo el 76%.
3. Las cianobacterias de los consorcios microbianos  $CM_A$ ,  $CM_B$  y  $CM_C$ , sobrevivieron durante los 30 días en los que fueron evaluados.
4. Las cianobacterias presentes en los consorcios microbianos se adaptaron al nuevo sustrato que fueron transferidas.
5.  $CM_C$  obtuvo el porcentaje más alto de humedad con el 78,26% frente al tratamiento químico del cuál se obtuvo 76,04% de agua.
6. Los valores más altos de proteína fueron los obtenidos de la aplicación de TBV y  $CM_A$  con 11,75% y 11,74% respectivamente superando al control químico (1,22%).
7. El porcentaje de fibra más adecuado para considerar un forraje de calidad fue el obtenido por  $CM_C$  con un valor del 4,08%.

## CAPÍTULO 6: RECOMENDACIONES

1. Evaluar el potencial fertilizante combinando un tratamiento que conste de consorcios de cianobacterias y fertilizantes orgánicos, para conocer la interacción y el potencial que pudiesen tener sobre variables morfoagronómicas y nutricionales de Raygrass
2. Analizar los efectos biofertilizantes de los consorcios  $CM_A$  y  $CM_C$ , en otro tipo de cultivos.
3. Probar la acción de los biofertilizantes sin el uso de sustratos estériles.
4. Realizar la investigación, considerando al menos tres cortes del Raygrass durante su desarrollo para conocer si los tratamientos biofertilizantes  $CM_A$  y  $CM_C$ , también demuestran potencial de rebrote después del corte del pasto.

## CAPÍTULO 7: BIBLIOGRAFÍA

1. Abed, R. & Golubic, S. (2009). Applications of cyanobacteria in biotechnology. *Journal of applied Microbiology* ISSN. 136 – 150 pp.
2. Abed, C., Safi, N., Koster, J., Beer, D., El-Nahnal, Y., Rullkotter, J. & Garcia, F. (2002). Microbial diversity of a heavily polluted microbial mat and its community changes following degradation of petroleum compounds. *Appl. Env. Microbiology*. 1674 – 1683 pp.
3. Aguirre J.F. (2006). *Biofertilizantes Microbianos*. Libro técnico N2. Instituto Nacional de investigaciones forestales, agrícolas y pecuarias. 201 p.
4. Ansín O., Deregibus A., Lanfranco J. & Ringuélet J. (2003). Rol del alga *Nostoc commune* en la promoción de la cobertura vegetal y el valor forrajero de pastizales alcalinos de la Pampa deprimida bonaerense. *Microbiología Agrícola, Un aporte de la investigación Argentina*. 1ª Edición, Santiago del Estero. Universidad Nacional de Santiago del Estero. p. 59-65.
5. Arbaiza T., (2008). Prácticas de análisis proximal, Extraído el 18 de Octubre, 211 de [http://www.unmsm.edu.pe/veterinaria/aula\\_virtual/nutricion\\_pregrado/unidad1/practica%20analisis%20proximal.pdf](http://www.unmsm.edu.pe/veterinaria/aula_virtual/nutricion_pregrado/unidad1/practica%20analisis%20proximal.pdf).
6. Arredondo, C. (1997). Parcelas de maíz y frijol en los valles centrales de Oaxaca. Instituto Nacional de Investigaciones Forestales Agrícolas y Pecuarias. Centro de Investigaciones Regionales del Pacífico Sur. Campo experimental Valles Centrales de Oaxaca. 26 p.
7. Basto G., & Fierro L., (1999). Manejo sostenible de praderas. Extraído el 16 de Septiembre de [http://www.agronet.gov.co/docs\\_si2/200671991159\\_manejo%20sostenible20de%20praderas.pdf](http://www.agronet.gov.co/docs_si2/200671991159_manejo%20sostenible20de%20praderas.pdf)
8. Batallas C. (2008). Conceptos modernos de formación, manejo y explotación de la pastura para mejorar la producción de leche. 1 – 30 pp.

9. Belmar G., Ramón J., Sánchez B., (2008). La historia de la Química. Anales de la Real Sociedad Española de Química. Extraído el 12 de marzo del 2011. <http://www.youblisher.com/p/81363-Introduccion-a-la-Quimica/>
10. Bejarano, C. A. & Restrepo R. (2002). Corporación autónoma regional del valle cauca. Cvc. Subdirección de Patrimonio Ambiental. PROGRAMA DE AGRICULTURA SOSTENIBLE Y BIOCOMERCIO, 35 – 40 pp.
11. Benítez, B. A. (2005). Avances Recientes en Biotecnología vegetal e ingeniería de plantas. Editorial Reverte. Sevilla - España p.98. [http://books.google.com/books?id=3kVFGjfMssAC&pg=PA98&dq=biofertilizantes&hl=es&ei=qJteTcrWFpS2tgfE9OGIDA&sa=X&oi=book\\_result&ct=result&resnum=3&ved=0CDIQ6AEwAg#v=onepage&q=biofertilizantes&f=false](http://books.google.com/books?id=3kVFGjfMssAC&pg=PA98&dq=biofertilizantes&hl=es&ei=qJteTcrWFpS2tgfE9OGIDA&sa=X&oi=book_result&ct=result&resnum=3&ved=0CDIQ6AEwAg#v=onepage&q=biofertilizantes&f=false)
12. Blanco, A., Garbisu, C., Alkorta, I., Llama M., (1999) Biotecnología con cianobacterias. [http://www.escet.urjc.es/biodiversos/esp/docencia/micro/micro\\_cianobacterias.pdf](http://www.escet.urjc.es/biodiversos/esp/docencia/micro/micro_cianobacterias.pdf)
13. Bernal, J. 2008. Manual de pastos y forrajes para Ecuador. Cuarta Edición. Editorial Santillán. Ecuador 170p.
14. Black N. & Mendiola K. (2007). The Nostoc symbiont of Lichens. Diversity, Specificity and Cellular Modification. Acta Universitatis Upsaliensis.
15. Caballero H. & Hervas, T. (2001). Producción Lechera en la Sierra Ecuatoriana, 1988. Ministerio de Agricultura y Ganadería. Asociación Hostein del Ecuador. 43 – 48 pp.
16. Caballero & Medardo (1999). Soil fertilization limits the genetic diversity of *Rhizobium* in bean nodules. Symbiosis, 26: 111 – 121 pp.
17. Casamatta, R., Hamedt, J., & Alvarez, A. (2005). Evaluación del establecimiento de tres variedades de pasto Raygrass (*Lolium sp.*) en potreros de pasto kikuyo (*pennisetum clandestinum*). Universidad de Antioquia. Facultad de Ciencias Agrarias. Departamento de producción agropecuaria. Escuela de Zootecnia. Medellín.



18. Castro L. (2002). Microbiología Agrícola. Capitulo 1. <http://www.unsa.edu.ar/matbib/micragri/micagricap1.pdf>
19. Carrapico, F. 2002. The Azolla- Anabaena- bacteria system as a natural microcosm. Proceedings of SPIE. Pp 261 – 265
20. Castellanos W. (2008). Nitrogen Fixation by Legumes. Guide A-192. Cooperative Extension Service. College of Agriculture and Home Economics. New Mexico State University.
21. Chapman, L., Wilcox, L. (2000). *Algae*. Prince Hall. Upper Saddle River. N.J. Int Microbioloy. 7 (3): 178 – 186.
22. Cruz, M. A. (2009). Uso biofertilizante de dos cultivos de cianobacterias, uno axénico y otro en consorcio, a nivel de invernadero para producción parcialmente orgánica de fréjol *Phaseolus vulgaris*. Escuela Politécnica del Ejército. Quito- Ecuador.
23. Cruz, D. & Jaquez, M. (2009). Evaluación del potencial forrajero del pasto Maralfalfa *Pennisetum violaceum* con diferentes niveles de fertilización de nitrógeno y fósforo con una base estándar de potasio. Chambo, Chimborazo, 2009. Escuela Superior Politecnica de Chimborazo. Facultad de ciencias pecuarias. 37 -88p.
24. Cubero Dioógenes, Viera Marcos (2001). Compatibilidad de Abonos orgánicos y fertilizantes químicos en la Agricultura. Guadalajara – México [http://www.mag.go.cr/congreso\\_agronomico\\_XI/a50-6907-III\\_061.pdf](http://www.mag.go.cr/congreso_agronomico_XI/a50-6907-III_061.pdf)
25. De León, L. (2000). Floración de cianobacterias, características, causas, efectos y recomendaciones. Ecología y ambiente. 78-85 pp.
26. Díaz, O., Lobo di Palma, M., (2001). Agrostología. Universidad Estatal a Distancia San José. Costa Rica. Editorial Eulac. [http://books.google.com/books?id=u1Wz8ok\\_puMC&pg=PA27&dq=pasto+raigras&hl=es&ei=e9tITY\\_gK8SWtwePkPT2DA&sa=X&oi=book\\_result&ct=book-humbnail&resnum=2&ved=0CC0Q6wEwAQ#v=onepage&q=pasto-%20raigras&f](http://books.google.com/books?id=u1Wz8ok_puMC&pg=PA27&dq=pasto+raigras&hl=es&ei=e9tITY_gK8SWtwePkPT2DA&sa=X&oi=book_result&ct=book-humbnail&resnum=2&ved=0CC0Q6wEwAQ#v=onepage&q=pasto-%20raigras&f).

27. Estévez, C. (1983). Microalgas del suelo. Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria. Estación Experimental Agropecuaria San Luis. Año 4. Número 14. 2,3 pp.
28. Estrada, A. (2002). Pastos y forrajes para el trópico colombiano. Universidad de Caldas. Editorial Universidad de Caldas. 239 – 303 pp.
29. Espino R. (2001). Informe de biofertilizantes en el estado de Morelos. Instituto Nacional de Investigaciones Forestales Agrícolas y Pecuarias. Centro de Investigaciones Regionales de Centro. Campo Experimental Zacatepec Morelos. 5 p.
30. Food and Agriculture Organisation (FAO) (2001). Food Insecurity Report. Rome: FAO. <http://www.eufic.org/article/es/expid/basics-agricultura/>
31. Flores, E., Wolk, C. P., 1986. Production, by filamentous, nitrogen – fixing cyanobacteria, of a bacteriocin and other antibiotics that kill related strains. Arch. Microbiology. Pp 215 -219.
32. Frioni L. 1999. Procesos Microbianos. XIX congreso de las ciencias del suelo –Paraná p 332.
33. Garbisu, C., Blanco, A., Alkorta, I., Llama, M., Serra, J. (1999). Biotecnología con cianobacterias. Investigación y ciencia. 64 – 71 pp.
34. Gastal, N., Montero, R., Bomhe A. (1993). Promoting Bio- fertilizers in India Agriculture. Institute of Economic Growth University Enclave. Delhi. 2-4 pp.
35. Gélvez L. (2008). “Raygrass – *Lolium multiforum*”, <http://www.mundopecuario.com/tema191/gramineas/raygrass-1049.html>. noviembre 2011.
36. Graham, L. & Wilcox, S. (2000). *Algae*. Capítulo 6. Cyanobacteria. Editorial Iberoamericana. 3era edición.
37. Gonzales W. (2006). “Estudio y evaluación en la Introducción de Pasturas: Cultivos Puros y asociados. Extraído el 12 de Agosto, 2011 de: [http://www.engormix.com/estudio\\_evalucion\\_intriduccin\\_pasturas\\_s\\_articulos\\_983\\_AGR.htm](http://www.engormix.com/estudio_evalucion_intriduccin_pasturas_s_articulos_983_AGR.htm).

38. Gutiérrez, H., De la Vara, R. (2008). Análisis y diseño de experimentos. Segunda edición. Mc Graw Hill. México. 80-99p.
39. Halbleib, N. & Luden S. (2000). Materia seca nodular y nitrógeno acumulado en cultivo de soja bajo diferentes condiciones de manejo. XIX Congreso de las ciencias del suelo. Paraná. 322 p.
40. Hannaway D., Fransen S., Cropper J., Teel M., Chaney M., Griggs ., Halse R., Hart J., Lane w., 1999, "Raygrass Annual", <http://forages.oregonstate.edu/organization/seed/osc/tech-puch/ar-span.pdf>
41. Herrero, A., Muro, A., Flores, E., 2001. Nitrogen Control in Cyanobacteria J. Bacteriol pp. 425
42. Holmes, W. (1998). Grazing management. Pages 130 – 171 in W. Holmes, ed. Grass –its production and utilization, British Grassland Society. Blackwell Scientific Publications. UK
43. Hubbell, D. (2003). Biological Nitrogen Fixation. University of Florida. IFAS. Extension SL- 16. 1-4 pp.
44. Iglesias, M., & Montero, R. (2005). Inoculación de cianobacterias en el cultivo de soja, efectos sobre la infectividad de *Bradyrhizobium japonicum* y la producción de materia seca. Comunicaciones científicas y tecnológicas. Resumen: A-052. Universidad Nacional del Nordeste 1- 4 pp.
45. Infante C. y Vásquez F., 2001. Desarrollo de la tecnología interciencia. Disponible en [www.interciencia.org/ov26\\_10/infante.pdf](http://www.interciencia.org/ov26_10/infante.pdf) fecha de consulta 16/02/11
46. Ingraham, L. J., Painter P. R., Stainer, R. Y., Wheelis, M. L., 1992. Microbiología. 2da Edición. Barcelona – España. Editorial Reverte S.A. pp. 381.
47. Khanum, H., Herrero A., Mulieneaux, C., Mariscal, V., Flores, E., Adams, D., (2008). Mechanism of intercelular molecular. Exchange in heterocyst – forming cyanobacteria. Appl. Microbiology. 4 (1). 156 -166 pp. EMBO J.

48. Koch, A. Naranjo, Villacis, N. Factos, A. García, M. (2008). Aislamiento, purificación y caracterización de cianobacterias procedentes de bosques nativos de *Polylepis pauta* para su aplicación en reforestación, recuperación de suelos y extracción de metabolitos secundarios. Revista Ciencia.
49. León, C., & Rojas, J. (2003). Utilización de cianobacterias (algas verde-azules) fijadoras de nitrógeno y el helecho acuático azolla, como biofertilizantes en el cultivo de arroz anegado. Extraído 2 septiembre, 2011.
50. León C., (1999) Producción y utilización de los pastizales de la zona alto andina. Primera edición. Editorial Red de Pastizales Andinos. 32p.
51. Lerner, H., Bohme, H., Masepohl, B. (1999). Plant responses to environmental stresses. Differentiation of Vegetative Anabaena cells into Nitrogen – Fixing heterocysts. University of Bonn. Alemania 91 – 92 pp.
52. Leyva, A., Hernández, A., Elein, T. (2005). Microorganismos benéficos como biofertilizantes eficientes para el cultivo de tomate. Rev. Colombia. Biotecnol. Vol VI No.2 47- 54 pp. Extraído el 17 de Agosto, 2011 de <http://www.inta.gov.ar/valleinferior/info/documentos/vegetal/organica.pdf>
53. Loreto, C., Rosales, N., Bermúdez, J., Morales, E. (2003). Pigment and protein production of the cyanobacterium Anabaena pcc 7120 in relation to nitrogen concentration and irradiance. Gayana Bot. 83-89p.
54. Lotario, J., Stuart, B., Lam, T., Arands, R., Kosson, D. (1995). Effects of sterilization methods on the physical characteristics of soil. Implication of sorption isotherm analyses, Env. Con. And tox. 4. 67 -69 pp. USA.
55. Marino, M. & Agnusdei S. (2005). Abastecimiento de P y N en pasturas. Claves para una ganadería productiva y sustentable. En: Simposio "Fertilidad 2005". Nutrición, Producción y Ambiente. pp 48-55.
56. Medina, N. (2009) Biotecnology and sustainable agricultura: biofertilizers and biopesticides. Natural Institute of Agricultural Science. Pp. 14-15. Extraído el 19 de noviembre, 2011 de [http://www.pugwash.org/resports/ess/Cuba2009/07\\_ondina.pdf](http://www.pugwash.org/resports/ess/Cuba2009/07_ondina.pdf)

57. Meeks, J.C., Elahai, J. (2002). Regulation of cellular differentiation in filamentous Cyanobacteria in Free – Living and Plant – Associated Symbiotic Growth states. *Microbiol. Mol. Biol.* 94 -121.
58. Mejías Guijo, M., Palomares Díaz, A.J., Ruíz Berraquero, F. (2000). Aportaciones a la biología de la fijación del nitrógeno. Publicaciones de la universidad de Sevilla. Extraído el 10 de julio, 2011 de [www.utexas.edu/world/lecture/mic/](http://www.utexas.edu/world/lecture/mic/)
59. Méndez, J. (2006). *Calotrix crustacea schousboe ex thuret*. Num 66. Extraído el 20 de Octubre del 2011 de:  
<http://www.asturnatura.com/especie/calotrix-crustacea.html>
60. Montaña, F. (2005). Estudio de la aplicación de *Azolla – Anabaena* como bioabono en el cultivo de arroz en el Litoral ecuatoriano. *Revista Tecnológica ESPOL*. Vol. 18, N. 1, 147 -151 pp. ISSN.
61. Montero R. (2008). Suplementación mineral en bovinos. Extraído el 29 de Abril, 2011 de [http://www.engormix.com/suplementación\\_mineral\\_bovinos\\_articulos\\_919\\_GDL.htm](http://www.engormix.com/suplementación_mineral_bovinos_articulos_919_GDL.htm).
62. Neyra, M. (2005). Manual técnico de la fijación simbiótica del nitrógeno. Organización de las Naciones Unidas para la agricultura y la alimentación. Technology and Engineering. Roma. 67 -85 pp.
63. Olivares R. (2006, Junio 1). El abuso de fertilizantes deteriora el suelo. *Diario “El Universo”*
64. Ortega J., Rivas R., Andrade C., Zambrano H. (2004). Cultivos no salinos de las cianobacterias *Limnothrix* y *Oscillatoria* exhiben toxicidad sobre Artemia. X Jornadas Nacionales de Investigación Científica. Facultad Experimental de Ciencias. Maracaibo. Venezuela. 46 pp.
65. Paniagua, G., Rodríguez, M., 1995. *Horticultura Orgánica*. Fundación Guilome, San José – Costa Rica. Serie 1. Volumen 2. Pp 7.
66. Peinador, M. 1999. Las cianobacterias como indicadores inmediatos de contaminación orgánica. *Rev. Bio. Trop.* Vol. 47. 381-391.

67. Pérez, S. & Gavilán, M. (2008) Potencial del uso de estiércol en la alimentación de los bovinos. Extraído el 2 de septiembre, 2011 de <http://www.fmvz.mx/fmv/ciencia/revistas/CVv1c10.pdf>. Julio, 2011.
68. Páres, R., & Juárez, A. (Eds.). (1997). Bioquímica de los microorganismos. Editorial Reverté. 313 -315 pp.
69. Pincemin J. M. (2007). Sistemas Silvopastoriles en el Delta del Río Paraná: producción de materia seca y estructura de gramíneas templada bajo álamos.
70. Pulgarín S. (2011). Respuesta de una mezcla forrajera establecida de clima frío, a la aplicación de silicato de magnesio. Facultad de Ingeniería Química y Agroindustria. Escuela politécnica nacional. 36 – 50 pp.
71. Pulz, O., Gross, W., 2004. Valuable products from biotechnology of microalgae. *Apl. Microbiol. Biotechnol.* 635 -648 pp. [http://www.aulados.net/Botanica/Curso\\_Botanica/Cyanophyta/3Cyanophyta\\_texto.pdf](http://www.aulados.net/Botanica/Curso_Botanica/Cyanophyta/3Cyanophyta_texto.pdf)
72. Rearte, D. (2003). Capítulo 2: Distribución regional de la ganadería argentina. En: Cría vacuna. Cuaderno de Actualización Técnica N°66. Septiembre 2003. CREA.
73. Restrepo, J., (2001). Elaboración de abonos orgánicos fermentados y biofertilizantes foliares. San Jose, Costa Rica  
[http://books.google.com/books?id=iJ08LJM69qAC&printsec=frontcover&dq=biofertilizantes&hl=es&ei=qJteTcrWFpS2tgfE9OGIDA&sa=X&oi=book\\_result&ct=result&resnum=1&ved=0CCgQ6AEwAA#v=onepage&q&f=false](http://books.google.com/books?id=iJ08LJM69qAC&printsec=frontcover&dq=biofertilizantes&hl=es&ei=qJteTcrWFpS2tgfE9OGIDA&sa=X&oi=book_result&ct=result&resnum=1&ved=0CCgQ6AEwAA#v=onepage&q&f=false)
74. Rippka R., Castenholz R., Iteman I., Herdman M., (2001). Anabaena. In: *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, Boone, D. R. and Castenholz, R.W. (Eds). Vol. 1, 2nd edition, Springer, New York. 566- 567 pp.
75. Rocalba S.A. (2005). "Semillas forrajeras y pratenses". Extraído el 8 de septiembre, 2011 de <http://www.rocalba.com/pdf/forrajeras.pdf>

76. Rodríguez B.C., Sevillano G.F., Subramaniam P., 1994. La Fijación de Nitrógeno Atmosférico. Biotecnología en la producción Agraria. Instituto de recursos Naturales y Agrobiológicos.
77. Sánchez, C. (2007). Cultivo y producción de pastos y forrajes. Ediciones Ripalme, Lipa –Perú. 17p.
78. Sandoval B. (2007). Características Agronómicas y nutricionales de Asociaciones de Gramíneas y Leguminosas Tropicales. Extraído el 05 de Agosto, 2011 de <http://proquest.umi.com/pqdlink?did=1383467801&fmt=14VTpe=PQD&VInst=PROD&RQT=309&VName=PQD&TS=1304457600&clientid=79356>
79. Santillán, N. (2005). Producción de biofertilizantes utilizando *Pseudomonas* sp. Ecología aplicada. Universidad Nacional Agraria la Molina, Lima – Perú. Extraído el 2 de julio, 2011 de <http://www.lamolina.edu.pe/ECOLAPL/pdf>
80. Sarukhán, J. 2004. Microbiología Ambiental. Instituto de Ecología. UNAM. Progame S.A.
81. Sasson A. (2007). Cultivation of *Spirulina*. Microalgal biotechnologies: recent developments and prospects for developing countries. 2nd Asia – Pacific Marine Biotechnol. Conf. Algal Biotechnol. Tailandia 11-31 pp.
82. Suquilanda , M. (1995). Guía para la producción orgánica de cultivos. Sica proyecto Banco Mundial. Extraído el 15 de diciembre, 2011 de <http://www.sica.gov.ec/agronegocios/productos%20para%20invertir/organicos/conceptos/principios%20agricultura.htm>
83. Tapia I. (2006). Análisis de Alimentos. Editorial científica Agustín Álvarez. Quito –Ecuador. 38- 40 pp.
84. Tekaling, T. and P.S. Hammes (2005). Growth and productivity of potato as influenced by cultivar and reproductive growth I. Stomatal conductance, rate of transpiration, net photosynthesis, and dry matter production and allocation. *Scientia Horticulturae* 105 (1): 13- 27.

85. Todar, K. (2004). Todar's Online Textbook of Bacteriology. Important groups of prokaryotes. Extraído el 10 de Septiembre, 2011 de: <http://www.textbookofbacteriology.net>
86. Torres; Arniño, A., 2001. Aislamiento y caracterización de cianobacterias marinas productoras de compuestos de interés biomédico. Tesis de maestría. Centro de investigación científica de Ensenada. Mexico. 94p. extraído el 10 de febrero del 2011.
87. Ulloa, D. (1993). Respuesta de tres variedades de fréjol (*Phaseolus vulgaris* L.) a la aplicación de zinc, azufre, y *rhizobium* en Imbabura. Universidad Central de Ecuador. 20 – 28 pp.
88. Ureta, A. (2002). Evidence for Conformational Protection of Nitrogenase against Oxygen in *Gluconacetobacter diazotrophicus* by a Purative FeSII Protein. J. Bacteriol. 184(20): 5805 – 5809.
89. Valderia, M. & Tellez A. (2003). Centro de Biotecnología Genómica del IPN (CBG), Reynosa, Tamaulipas. Extraído el 05 de Agosto de 2011 de <http://journalmex.wordpress.com/2009/03/02/biofertilizante-para-aumentar-la-produccion-de-plantas-agricolas/>
90. Yu H., Shiru J., Dai Y. (2009). Growth characteristics of the cyanobacterium *Nostoc flageliforme* in photoautotrophic, mixitrophic and heterotrophic cultivation. Journal of Applied Phycology.
91. Zaccaro M. (2005). Biofertilizantes cianobacterias: una estrategia ecológica para mejorar la producción vegetal. Extraído el 11 de Julio, 2011 de: <http://www.rec.uba.ar/programacion%2098-00/html/tx79.html>.



## ANEXO A

### Preparación de medio de cultivo para cianobacterias BG-11<sub>o</sub> líquido

Para la preparación del medio de cultivo BG-11<sub>o</sub> líquido se realizó por separado la solución de macroelementos y microelementos que se detallan en las tablas A y B las cuales contienen elementos necesarios para promover el crecimiento de cianobacterias.

Los metales traza descrito a continuación fueron disueltos en un litro de agua desionizada.

**Tabla A.** Metales traza medio de cultivo BG-11<sub>o</sub>

Reactivo	Formula	g/L
Molibdato de Sodio dihidratado	$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0,39
Acido Bórico	$\text{H}_3\text{BO}_4$	2,84
Nitrato de Cobalto hexahidratado	$\text{CO}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0,49
Cloruro de manganeso tetrahidratado	$\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	1,81
Sulfato de Zinc heptahidratado	$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,222
sulfato de Cobre pentahidratado	$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0,079

Los macronutrientes descritos en la tabla B fueron disueltos en un litro de agua desionizada y mezclados con agitación magnética a continuación se añadió 1mL de la solución de metales traza, se verificó que el pH se encontraba en 7,4 caso contrario se lo ajusto con un ácido o base según el caso, y se esterilizó el medio por autoclave a 121°C y 15 psi de presión.

**Tabla B.** Macroelementos medio de cultivo BG-11<sub>o</sub>

<b>Reactivo</b>	<b>Formula</b>	<b>g/L</b>
Fosfato bipotásico	$K_2HPO_4$	0,04
Sulfato de magnesio heptahidrato	$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0,075
Cloruro de Calcio dihidratado	$ClCa \cdot 2H_2O$	0,036
Acido Citrico	$C_6H_8O_7$	0,06
Citrato de Amonio Férrico	$Fe(NH_4)HC_6H_5O_7$	0,006
Carbonato de sodio	$Na_2CO_3$	0,02
EDTA disodico	EDTA - $Na_2$	0,001

### **Preparación de medio de cultivo para cianobacterias BG-11<sub>o</sub> sólido**

Para la preparación del medio de cultivo sólido se disolvió los macroelementos y microelementos en 500 mL de agua desionizada conservando los mismos valores en gramos usados para un litro. En otro recipiente se disolvió 12.5 g agar – agar con la ayuda de agitación magnética y calentamiento hasta ebullición del medio. Se esterilizó ambos medios a 121°C y 15 psi de presión por 15 min. Se dejó enfriar las soluciones por 10 minutos vigilando que el agar no solidifique, se mezcló e inmediatamente se dispensó e cajas Petri esterilizadas previamente.

## ANEXO B

### Estadística empleada en el estudio

Para la fase experimental se empleó un diseño completamente al azar (DCA) en el cual se investigó la influencia de los diferentes fertilizantes (tratamientos) sobre las variables de morfoagronómicas y nutricionales de Raygrass annual. Se escogió trabajar con este diseño puesto que las unidades experimentales fueron bastante homogéneas y que desde el punto de vista estadístico, este diseño considera dos fuentes de variabilidad que son los tratamientos y error aleatorio considerándose el diseño más simple para comparar dos o más tratamientos (Gutierrez & de la Vara, 2008).

Se realizó análisis de varianza en el DCA con el objetivo de probar la hipótesis de igualdad de los tratamientos fertilizantes con respecto a la media de la correspondiente variable de respuesta

$$H_0 : \mu_1 = \mu_2 \dots = \mu_k = \mu$$

$$H_A : \mu_i \neq \mu_j \text{ para algún } i \neq j$$

A partir de lo cual se decidió si los tratamientos son iguales estadísticamente, frente a la posibilidad de que al menos dos de ellos sean diferentes, el análisis de varianza, nos indicó que las diferencias por tratamientos eran significativas respecto a la evaluación morfoagronómica y nutricional de las plantas de Raygrass.

Mediante estos resultados se aceptó la hipótesis alternativa, en la que los tratamientos resultaron tener diferentes influencias sobre las variables estudiadas, por lo que hizo indispensable para la investigación conocer cual resultaba ser el mejor tratamiento fertilizante, por lo que se utilizó la prueba de LSD- Fisher para conocer cuáles medias eran iguales y cuales distintas.

La prueba LSD de Fisher se basa en el ensayo “t” de significación de diferencia de medias, la cuál calcula la “menor diferencia significativa” entre dos medias cualesquiera del conjunto analizado mediante un ANOVA (Gutierrez & de la Vara, 2008).

Con la prueba LSD Fisher se probó la igualdad de todos los posibles pares de medias con la hipótesis:

$$H_0 : \mu_i = \mu_j$$

$$H_A : \mu_i \neq \mu_j$$

Para toda  $i \neq j$ . Para  $k$  tratamientos se tiene en total  $k(k-1)/2$  pares de medias. El estadístico de prueba de cada una de las hipótesis dadas en la siguiente ecuación es la correspondiente diferencia en valor absoluto entre sus medias muestrales  $|\bar{y}_i - \bar{y}_j|$ . Se rechaza la hipótesis  $H_0 : H_i = \mu$ , si ocurre que

$$|\bar{y}_i - \bar{y}_j| > t_{\alpha/2, N-t} \sqrt{CM_E \left( \frac{1}{n_i} + \frac{1}{n_j} \right)} = LSD$$

Donde el valor  $t_{\alpha/2, N-t}$  se lee en las tablas de distribución  $T$  de student con  $N-k$  grados de libertad que corresponden al error. El  $CM_E$  es el cuadrado medio del error y se obtiene de la tabla ANOVA,  $n_i$  y  $n_j$  son el número de observaciones para los tratamientos  $i$  y  $j$  respectivamente.

Mediante la prueba LSD Fisher se observó la diferencia mínima que debe existir entre dos medias muestrales para considerar que los tratamientos correspondientes son significativamente diferentes. Así, cada diferencia de medias muestrales en valor absoluto que sea mayor que el número LSD se declara significativa.

Si el diseño resulta balanceado es decir  $n_1=n_2=\dots=n_k=n$ , la diferencia mínima significativa se reduce a  $LSD = t_{\alpha/2, N-t} \sqrt{2CM_E \ln}$ . En caso de rechazar  $H_0$  se acepta la hipótesis alternativa  $H_A : \mu_i \neq \mu_j$ , con la cual se pudo concluir para la presente investigación que las medias de los tratamientos  $i$  y  $j$  fueron diferentes (Gutierrez & de la Vara, 2008).

## CERTIFICACIÓN

M.C. Alma Koch

Ing. Pedro Romero

Certifican:

Que el trabajo titulado “Evaluación del potencial biofertilizante de tres consorcios de cianobacterias en el crecimiento y valor nutricional del pasto Ryegrass anual (*Lolium multiflorum*) a nivel de cámara de invernadero”, realizado por Freire Egas Rocío Elizabeth, ha sido guiado y revisado periódicamente y cumple normas estatutarias establecidas por la ESPE, en el Reglamento de Estudiantes de la Escuela Politécnica del Ejército.

Debido a que la presente investigación contribuye a futuros estudios sobre nuevos tratamientos biofertilizantes si recomiendan su publicación.

El mencionado trabajo consta de un documento empastado y un disco compacto el cual contiene los archivos en formato portátil de Acrobat(pdf). Autorizan a Freire Egas Rocío Elizabeth que lo entregue a la Ing. Tatiana Páez, en su calidad de Coordinadora de la Carrera.

Sangolquí, 12 de Junio de 2012

---

**M.C Alma Koch**

DIRECTOR

---

**Ing. Pedro Romero**

CODIRECTOR

## DECLARACIÓN DE RESPONSABILIDAD

FREIRE EGAS ROCÍO ELIZABETH

Declaro que:

El proyecto de grado denominado “Evaluación del potencial biofertilizante de tres consorcios de cianobacterias en el crecimiento y valor nutricional del pasto Ryegrass anual (*Lolium multiflorum*) a nivel de cámara de invernadero”, ha sido desarrollado con base a una investigación exhaustiva, respetando derechos intelectuales de terceros, conforme las citas que constan al pie de las páginas correspondientes, cuyas fuentes se incorporan en la bibliografía. Consecuentemente este trabajo es de mí autoría.

En virtud de esta declaración, me responsabilizo del contenido, veracidad y alcance científico del proyecto de grado en mención.

Sangolquí, 12 de Junio de 2012

---

**Freire Egas Rocío Elizabeth**

# AUTORIZACIÓN

Yo, Freire Egas Rocío Elizabeth

Autorizo a la Escuela Politécnica del Ejército la publicación, en la biblioteca virtual de la Institución del trabajo “Evaluación del potencial biofertilizante de tres consorcios de cianobacterias en el crecimiento y valor nutricional del pasto Ryegrass anual (*Lolium multiflorum*) a nivel de cámara de invernadero”, cuyo contenido, ideas y criterios son de mi exclusiva responsabilidad y autoría.

Sangolquí, 12 de Junio de 2012

---

**Freire Egas Rocío Elizabeth**