



**ESPE**  
UNIVERSIDAD DE LAS FUERZAS ARMADAS  
INNOVACIÓN PARA LA EXCELENCIA

**DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA VIDA Y DE LA  
AGRICULTURA**

**CARRERA DE INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA**

**TESIS PREVIO A LA OBTENCIÓN DEL TÍTULO DE INGENIERA EN  
BIOTECNOLOGÍA**

**AUTOR: VANESSA MARIBEL ABAD VALAREZO**

**TEMA: EVALUACIÓN DEL CRECIMIENTO Y VALOR NUTRICIONAL DE  
LA SOYA PARA FORRAJE (*Glycine max*) UTILIZANDO BIOL COMO ABONO  
OBTENIDO CON MICROORGANISMOS NATIVOS.**

**DIRECTORA: MC. KOCH KAISER, ALMA**

**CODIRECTOR: ING.-MAT. ROMERO SAKER, PEDRO**

**SANGOLQUÍ, MARZO 2014**

## CERTIFICACIÓN

Alma Koch Kaiser, MC.

Ing.-Mat. Pedro Romero Saker

### **Certifican:**

Que el trabajo titulado “**Evaluación del crecimiento y valor nutricional de la soya para forraje (*Glycine max*) utilizando biol como abono obtenido con microorganismos nativos**”, realizado por **Vanessa Maribel Abad Valarezo**, ha sido guiado y revisado periódicamente y cumple normas estatutarias establecidas en el Reglamento de Estudiantes de la Universidad de las Fuerzas Armadas- ESPE.

Sangolquí, Marzo 2014

---

**Alma Koch Kaiser, MC.**

DIRECTORA

---

**Ing.-Mat. Pedro Romero Saker**

CODIRECTOR

## DECLARACIÓN DE RESPONSABILIDAD

Yo, VANESSA MARIBEL ABAD VALAREZO

**Declaro que:**

El proyecto de grado denominado “**Evaluación del crecimiento y valor nutricional de la soya para forraje (*Glycine max*) utilizando biol como abono obtenido con microorganismos nativos**”, 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 mi autoría.

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

Sangolquí, Marzo 2014

---

**Vanessa Maribel Abad Valarezo**

## AUTORIZACIÓN

Yo, VANESSA MARIBEL ABAD VALAREZO

**Autorizo que:**

El proyecto de grado denominado “**Evaluación del crecimiento y valor nutricional de la soya para forraje (*Glycine max*) utilizando biol como abono obtenido con microorganismos nativos**”; sea publicado en la biblioteca virtual de la Universidad de las Fuerzas Armadas – ESPE.

Sangolquí, Marzo del 2014

---

**Vanessa Maribel Abad Valarezo**

## **DEDICATORIA**

El presente trabajo está dedicado a mis padres, hermanos, seres queridos y en especial a mi abuelito Carlos.

**Vanessa Maribel Abad Valarezo**

## AGRADECIMIENTO

A Dios por ser mi fortaleza y guía. A mis padres por todo su apoyo e inculcar en mí, la perseverancia y responsabilidad, cualidades que hoy me han permitido cumplir con más objetivos, así mismo a mis hermanas y mis queridos sobrinos por ser mi motivación, sobre todo por brindarme su amor incondicional.

A mi Directora y Codirector de tesis, Alma Koch Kaiser, MC. e Ing.-Mat. Pedro Romero Saker, por todo el respaldo y conocimientos brindados, además por enseñarme que la constancia es una virtud que hay que sobrellevarla con coraje.

A Wil por su ayuda en todo el proceso e ilustrarme con su ejemplo que los sueños solo se materializarán si se está dispuestos a vivirlos.

A las hermanas que la vida me dio, Pao y Diana, con ustedes compartí agradables experiencias y durante mi preparación supieron brindarme palabras de aliento cuando lo necesitaba.

También por la participación de la Lic. Jessica Maisincho, encargada del Laboratorio de Microbiología y a los amigos que pude conocer durante mi preparación, Dani, Henry, Gaby F., Alexita, Liz, Fer, Gaby G., Andre, Carlitos y Alejo, que hicieron más gratos mis días.

Finalmente a todos los amigos que hice en el transcurso de mi vida estudiantil e investigativa, a los que han formado parte de mi vida y a los que hoy ya no pueden estar, gracias por dejarme aprender de ustedes.

**Vanessa Maribel Abad Valarezo**

## ÍNDICE DE CONTENIDOS

LEGALIZACIÓN DE FIRMAS .....	i
CERTIFICACIÓN .....	ii
DECLARACIÓN DE RESPONSABILIDAD .....	iii
AUTORIZACIÓN .....	iv
DEDICATORIA .....	v
AGRADECIMIENTOS .....	vi
ÍNDICE DE CONTENIDOS .....	viii
ÍNDICE DE TABLAS .....	xiii
ÍNDICE DE FIGURAS.....	xvi
ÍNDICE DE ANEXOS.....	xx
RESUMEN.....	xxii
ABSTRACT .....	xxiii
<b>CAPÍTULO 1: INTRODUCCIÓN .....</b>	<b>1</b>
1.1. Formulación del problema .....	1
1.2. Justificación del problema .....	4
1.3. Objetivos de la investigación .....	6
1.3.1. Objetivo general.....	6
1.3.2. Objetivos específicos .....	6
1.4. Marco teórico .....	7
1.4.1. Biofertilizante .....	7
1.4.1.1. Composición del biol .....	9



1.4.2. Digestión anaerobia.....	11
1.4.3. Etapas de la fermentación .....	12
1.4.3.1. Hidrólisis y fermentación.....	12
1.4.3.2. Acetogénesis .....	13
1.4.3.3. Metanogénesis.....	14
1.4.4. Factores que intervienen en las fermentaciones .....	14
1.4.4.1. pH.....	14
1.4.4.2. Relación C/N.....	15
1.4.4.3. Otros factores .....	16
1.4.5. Inocuidad y calidad de los fermentos .....	16
1.4.6. Microorganismos nativos .....	17
1.4.6.1 <i>Saccharomyces</i> spp .....	18
1.4.6.2 <i>Lactobacillus</i> spp.....	19
1.4.6.3 <i>Aeromonas</i> spp .....	20
1.4.7. Beneficios de los microorganismos como biofertilizantes.....	21
1.4.8. Generalidades de la soya .....	22
1.4.9. Calidad de la soya .....	23
1.4.9.1. Proteína .....	24
1.5. Hipótesis .....	25
<b>CAPÍTULO 2: MATERIALES Y MÉTODOS.....</b>	<b>26</b>
2.1. Participantes.....	26
2.2. Zona de estudio .....	26
2.3. Periodo de tiempo de investigación .....	27
2.4. Diseño .....	27

2.5. Procedimiento .....	28
2.5.1. Recolección de muestras .....	29
2.5.2. Obtención del inóculo de microorganismos .....	30
2.5.2.1. Aislamiento de <i>Saccharomyces</i> spp .....	30
2.5.2.2. Aislamiento de <i>Lactobacillus</i> spp .....	31
2.5.2.3. Aislamiento de <i>Aeromonas</i> spp .....	31
2.5.3. Masificación y mantenimiento de los microorganismos .....	33
2.5.4. Elaboración del biol .....	34
2.5.5. Análisis del biol .....	36
2.5.6. Aplicación del biol .....	36
2.5.7. Evaluación del crecimiento de soya .....	37
2.5.7.1. Medición de la altura de plantas de soya .....	37
2.5.7.2. Medición del área foliar .....	38
2.5.7.3. Medición de longitud de la raíz principal .....	38
2.5.8. Evaluación del valor nutricional .....	39
2.5.2.1. Extracción de proteínas vegetales .....	39
2.5.2.2. Cuantificación de proteínas vegetales .....	41
2.6. Análisis de datos .....	42
2.6.1. Análisis del volumen del biol .....	42
2.6.2. Análisis químico y microbiológico del biol .....	42
2.6.3. Análisis del crecimiento de la soya .....	43
2.6.4. Análisis nutricional de la soya .....	43
<b>CAPÍTULO 3: RESULTADOS</b> .....	<b>44</b>
3.1. Inóculo de microorganismos .....	44

3.2. Análisis del volumen de biol.....	46
3.3. Análisis de la composición del biol .....	47
3.3.1 Análisis químico del biol .....	48
3.3.2 Análisis microbiológico del biol .....	48
3.3.2.1 Morfología de la colonia.....	48
3.3.2.2 Morfología microscópica de los microorganismos.....	51
3.3.2.3 Identificación de microorganismos.....	51
3.4. Análisis del crecimiento de soya.....	53
3.4.1. Medición de la altura de plantas de soya.....	53
3.4.2. Medición de área foliar .....	56
3.4.3. Medición de la longitud de la raíz principal.....	57
3.5 Análisis de variables nutricionales.....	59
3.5.1. Contenido de proteínas en plantas de soya.....	60
<b>CAPÍTULO 4: DISCUSIÓN .....</b>	<b>62</b>
4.1. Inóculo de microorganismos.....	62
4.2. Análisis del volumen de biol.....	64
4.3. Análisis químico y microbiológico del biol.....	65
4.4. Análisis del crecimiento de soya.....	69
4.4.1. Medición de la altura de plantas de soya.....	69
4.4.2. Medición del área foliar .....	72
4.4.3. Medición de la longitud de la raíz principal.....	73
4.5. Análisis de las variables nutricionales .....	74

<b>CAPÍTULO 5: CONCLUSIONES</b> .....	76
<b>CAPÍTULO 6: RECOMENDACIONES</b> .....	78
<b>CAPÍTULO 7: BIBLIOGRAFÍA</b> .....	79
<b>ANEXOS</b> .....	89

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1.1:</b>	Análisis bioquímico de biofermentos elaborados con estiércol y estiércol junto con alfalfa picada (Gomero, 2005).....	10
<b>Tabla 1.2:</b>	Caracterización bromatológica de los forrajes, % (Díaz <i>et al.</i> , 2003).....	24
<b>Tabla 1.3:</b>	Aminoácidos de la soya (Saltos, 2009).....	25
<b>Tabla 2.1:</b>	Tratamientos en la fase de elaboración de biol.....	27
<b>Tabla 2.2:</b>	Tratamientos en la fase de elaboración y aplicación.....	28
<b>Tabla 2.3:</b>	Proporción de cada uno de los ingredientes por biodigestor de 30 L de cada una de las formulaciones de biol en estudio (Robalino, 2011).....	35
<b>Tabla 2.4:</b>	Dosificación del biol para un volumen de total de 20 L.....	37
<b>Tabla 2.5:</b>	Soluciones estándar y muestra problema de proteínas (Lowry, Rosebrough, Lewis, & Randall, 1951).....	41
<b>Tabla 3.1:</b>	Análisis de la varianza para la variable volumen en InfoStat.....	46
<b>Tabla 3.2:</b>	Prueba Duncan para la variable volumen de biol en InfoStat.....	47
<b>Tabla 3.3:</b>	Géneros de microorganismos encontrados en los biodigestores analizados (Abad, 2014).....	53
<b>Tabla 3.4:</b>	Análisis de la varianza para la variable altura en InfoStat.....	53
<b>Tabla 3.5:</b>	Prueba Duncan para la variable altura en InfoStat.....	54
<b>Tabla 3.6:</b>	Análisis de la varianza para la variable área foliar en InfoStat.....	56
<b>Tabla 3.7:</b>	Prueba Duncan para la variable área foliar en InfoStat.....	56

<b>Tabla 3.8:</b>	Análisis de la varianza para la variable longitud de la raíz primaria en InfoStat.....	57
<b>Tabla 3.9:</b>	Prueba Duncan para la variable longitud de la raíz en InfoStat.....	58
<b>Tabla 3.10:</b>	Análisis de la varianza para la variable concentración proteica en InfoStat.....	60
<b>Tabla 3.11:</b>	Prueba Duncan para la variable concentración proteica en InfoStat.....	61
<b>Tabla A:</b>	Componentes del medio sólido para levaduras.....	89
<b>Tabla C:</b>	Componentes del medio MRS sólido para <i>Lactobacillus</i> .....	91
<b>Tabla D:</b>	Componentes del medio sólido para <i>Aeromonas</i> .....	92
<b>Tabla E:</b>	Componentes del medio líquido para levaduras.....	93
<b>Tabla F:</b>	Componentes del medio MRS líquido para <i>Lactobacillus</i> .....	94
<b>Tabla G:</b>	Componentes del caldo nutriente.....	95
<b>Tabla I.1:</b>	Test Shapiro-Wilks para la variable volumen de biol en InfoStat.....	97
<b>Tabla I.2:</b>	Prueba de Levene para la variable volumen de biol en InfoStat.....	98
<b>Tabla I.3:</b>	Test Kruskal Wallis para la variable volumen en InfoStat.....	98
<b>Tabla I.4:</b>	Test Shapiro-Wilks para la variable crecimiento en InfoStat.....	98
<b>Tabla I.5:</b>	Prueba de Levene para la variable crecimiento en InfoStat.....	99
<b>Tabla I.6:</b>	Test Shapiro-Wilks para la variable área foliar en InfoStat.....	100
<b>Tabla I.7</b>	Prueba de Levene para la variable área foliar en InfoStat.....	100
<b>Tabla I.8:</b>	Test Shapiro-Wilks para la variable longitud de la raíz en InfoStat. ....	101
<b>Tabla I.9:</b>	Prueba de Levene para la variable longitud de la raíz en InfoStat.....	102

<b>Tabla I.10:</b> Test Shapiro-Wilks para la variable concentración proteica en InfoStat.....	102
<b>Tabla I.11:</b> Prueba de Levene para la variable concentración proteica en InfoStat.....	103

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 2.1:</b> Trampas de microorganismos colocadas en la quinta “Winchele” (Abad, 2014).....	29
<b>Figura 2.2:</b> Pruebas de fermentación de carbohidratos para identificación de <i>Saccharomyces</i> (Abad, 2014).....	31
<b>Figura 2.3:</b> Columnas de Winogradsky elaboradas para el aislamiento de <i>Aeromonas</i> (Abad, 2014).....	32
<b>Figura 2.4:</b> Toma de muestras de: A) las columnas de Winogradsky y B) del medio enriquecido (Abad, 2014).....	32
<b>Figura 2.5:</b> Masificación de <i>Saccharomyces</i> , <i>Lactobacillus</i> y <i>Aeromonas</i> (Abad, 2014).....	33
<b>Figura 2.6:</b> Digestores para la elaboración de biol (Abad, 2014).....	35
<b>Figura 2.7:</b> Medición de la altura de las plantas de soya (Abad, 2014).....	37
<b>Figura 2.8:</b> Hojas de soya: A) fotografía digital, B) imagen editada en Adobe Photoshop y C) imagen procesada en Matlab (Abad, 2014).....	38
<b>Figura 2.9:</b> Medición de la longitud de la raíz principal de las plantas de soya (Abad, 2014).....	39
<b>Figura 2.10:</b> Extracción de proteínas de las plantas de soya: A) lavado, B) secado, C) macerado y D) agitación con NaOH 0.2 N (Abad, 2014).....	40



<b>Figura 2.11:</b> Proceso de extracción de proteínas: A) extracto proteico centrifugado y B) precipitación de proteínas de soya (Abad, 2014).....	40
<b>Figura 2.12:</b> Cuantificación de proteínas: A) coloración de proteínas con el reactivo de Lowry-Folin y B) lectura de absorbancia a 500 nm (Abad, 2014).....	42
<b>Figura 3.1:</b> Fermento de las trampas de microorganismos (Abad, 2014).....	44
<b>Figura 3.2:</b> Incubación de las columnas de Winogradsky a: A) primera semana, B) segunda semana, C) tercera semana y D) cuarta semana (Abad, 2014).....	45
<b>Figura 3.3:</b> Inóculo de microorganismos: A) vista macroscópica del crecimiento en agar B) vista microscópica a 100X (Abad, 2014).....	45
<b>Figura 3.4:</b> Variabilidad del volumen de biol producido en los diferentes tratamientos en InfoStat (Abad, 2014).....	46
<b>Figura 3.5:</b> Siembra de biol en medio <i>Salmonella-Shigella</i> (Abad, 2014).....	48
<b>Figura 3.6:</b> Siembra de biol en medio: A) PDA, B) TSA, C) AN y D) MRS agar (Abad, 2014).....	49
<b>Figura 3.7:</b> Número de cepas de acuerdo al color de la colonia en los distintos agares en Excel (Abad, 2014).....	50
<b>Figura 3.8:</b> Número de cepas de acuerdo a la consistencia de las colonia en los distintos agares en Excel (Abad, 2014).....	50

<b>Figura 3.9:</b> Vista microscópica a 100X de: A) bacilos Gram negativos, B) bacilos Gram negativos, C) levaduras del AR y D) levaduras del PDA (Abad, 2014).....	51
<b>Figura 3.10:</b> Siembra en CHROMA agar de colonias de levaduras provenientes de: A) MRS agar y B) PDA (Abad, 2014).....	52
<b>Figura 3.11:</b> Pruebas de: A) fermentación de carbohidratos para levaduras en AR, B) fermentación de carbohidratos para levaduras en PDA, C) urea, D) agar McConkey y E) asimilación de nitratos (Abad, 2014).....	52
<b>Figura 3.12:</b> Promedio de la altura de plantas de soya con las diferentes dosis de aplicación de biol con <i>Lactobacillus</i> en Excel (Abad, 2014).....	55
<b>Figura 3.13:</b> Dinámica del crecimiento de plantas de soya durante 45 días de crecimiento en Excel (Abad, 2014).....	55
<b>Figura 3.14:</b> Variabilidad del área foliar de las plantas de soya con diferentes dosis de aplicación de biol con <i>Lactobacillus</i> en Excel (Abad, 2014).....	57
<b>Figura 3.15:</b> Longitud de la raíz principal de plantas de soya del tratamiento: A) dosis del 25% de concentración de biol, B) dosis del 50% de concentración de biol, C) dosis del 75% de concentración de biol, D) biol químico y E) testigo (Abad, 2014).....	58
<b>Figura 3.16:</b> Variabilidad de la longitud de la raíz de las plantas de soya con diferentes dosis de aplicación de biol con <i>Lactobacillus</i> en Excel (Abad, 2014).....	59

<b>Figura 3.17:</b> Curva de calibración a partir de las soluciones estándar de ASB en Excel (Abad, 2014).....	60
<b>Figura 3.18:</b> Variabilidad de la concentración de proteína en las plantas de soya con diferentes dosis de aplicación de biol con <i>Lactobacillus</i> en Excel (Abad, 2014).....	61
<b>Figura I.1:</b> Valores del volumen producido de biol en los diferentes tratamientos en InfoStat (Abad, 2014).....	97
<b>Figura I.2:</b> Valores del crecimiento de soya en los diferentes tratamientos en InfoStat (Abad, 2014).....	99
<b>Figura I.3:</b> Valores del área foliar de plantas de soya en los diferentes tratamientos en InfoStat (Abad, 2014).....	100
<b>Figura I.4:</b> Valores de la longitud de la raíz de plantas de soya en los diferentes tratamientos en InfoStat (Abad, 2014).....	101
<b>Figura I.5:</b> Normalidad con los valores de la concentración proteica en plantas de soya con diferentes tratamientos en InfoStat (Abad, 2014).....	102

## ÍNDICE DE ANEXOS

<b>ANEXO A:</b> Preparación del medio de cultivo sólido para levaduras.....	89
<b>ANEXO B:</b> Algoritmo de identificación de levaduras (Linares & Solís, 2007).....	90
<b>ANEXO C:</b> Preparación del medio de cultivo MRS sólido para bacterias ácido lácticas.....	91
<b>ANEXO D:</b> Preparación del medio de cultivo sólido modificado por Van Niel'sYeast.....	92
<b>ANEXO E:</b> Preparación del medio de cultivo líquido para levaduras.....	93
<b>ANEXO F:</b> Preparación del medio de cultivo MRS líquido para bacterias ácido lácticas.....	94
<b>ANEXO G:</b> Preparación del medio de cultivo líquido modificado por Van Niel'sYeast.....	95
<b>ANEXO H:</b> Preparación de soluciones para la cuantificación de proteínas por el método de Lowry (Lowry <i>et al.</i> , 1951).....	96
<b>ANEXO I:</b> Supuestos empleados en el análisis estadístico.....	97
<b>ANEXO J:</b> Estadística empleada en el estudio.....	104
<b>ANEXO K:</b> Algoritmo de identificación de levaduras (Deák, 1992).....	108
<b>ANEXO L:</b> Pruebas bioquímicas realizadas a las colonias de levaduras presentes en el biol con <i>Lactobacillus</i> (Abad, 2014).....	110
<b>ANEXO M:</b> Confirmación de las especies bacterianas <i>Lactobacillus</i> <i>paracasei</i> , <i>Serratia plymuthica</i> , <i>Aeromonas hydrophila</i> y de	

hongos levaduriformes <i>Saccharomyces cerevisiae</i> , <i>Pichia subpelliculosa</i> y <i>Candida diddensiae</i> mediante el empleo del sistema API (Abad, 2014).....	111
<b>ANEXO N:</b> Crecimiento de pantas de soya a los 5, 10, 15 y 30 días de aplicación del biol (Abad, 2014).....	113
<b>ANEXO O:</b> Informe entregado por el Laboratorio de Fertilizantes de Agrocalidad, sobre la composición química del biol elaborado con <i>Lactobacillus</i> .....	114
<b>ANEXO P:</b> Informe entregado por el Laboratorio de Suelos de Agrocalidad, sobre la composición química del suelo previo a la aplicación de los fertilizantes.....	115

## RESUMEN

La producción de soya en Ecuador se ha visto afectada, reduciéndose en los últimos años, por ello la elaboración y aplicación de biol se realizó con el propósito de dar alternativas de manejo al cultivo. El objetivo de este trabajo consistió en evaluar la eficiencia del biol elaborado con microorganismos nativos de suelo sobre el contenido nutricional y desarrollo del crecimiento de soya (*Glycine max*). La respuesta de un mayor volumen de biol se evaluó en base a la eficiencia de *Lactobacillus* spp., *Saccharomyces* spp., *Aeromonas* spp. y una mezcla de microorganismos, seleccionados por su buen crecimiento en medios selectivos. Buenos resultados se obtuvieron al emplear diferentes inóculos en la elaboración de biol, sin embargo, se apreciaron diferencias significativas (valor  $p = 0.0241$ ), alcanzando el biol con *Lactobacillus* un mayor volumen de producción de 30,15 L. Por tanto, al evaluarlo sobre cultivos de soya en concentraciones de 25, 50 y 75% de biol, comparados con un testigo (agua) y un tratamiento químico, se obtuvieron diferencias significativas (valor  $p = 0.002$ ), sobre la altura para el tratamiento con el 25% de biol con 56.80 cm, una mayor área foliar para el tratamiento químico (valor  $p = 0.0001$ ), con 48.61 cm<sup>2</sup> y para el contenido proteico (valor  $p = 0.0355$ ) el tratamiento con 75% de biol influyó positivamente en la síntesis de proteína, con un valor de 6,35 mg/mL. A pesar de no existir diferencias significativas para la variable longitud de la raíz principal (valor  $p = 0.4248$ ), el tratamiento con 50% de biol presentó una mayor longitud.

**Palabras clave:** Biol, microorganismos nativos, fermentación, soya, proteína.

## ABSTRACT

Soybean production in Ecuador has been affected, decreasing in recent years, so the development and implementation of bioferments was performed in order to have crop management alternatives related to nutrition and pests defenses. The objective of this study was to evaluate the efficiency of biol elaborated with native soil microorganisms in the nutritional content and growth of soybeans (*Glycine max*). However, a larger volume of biol produced depends on the microorganism inoculated. It was evaluated the efficiency of *Lactobacillus* spp., *Saccharomyces* spp., *Aeromonas* spp. and a mixture of microorganisms, which were select on the good growth of selective media. Good results were obtained by using different microorganisms in developing biol, however, significant differences ( $p$ -value = 0.0241) between treatments were observed. Biol with *Lactobacillus* showed the better production volume of 30.15 L. Concentrations of 25, 50 and 75 % of biol were compared with a control (water) and a chemical treatment in the crop. Significant differences ( $p$ -value = 0.0002) was obtained on the height for 25% of biol with 56.80 cm. Increased leaf area ( $p$ -value = 0.0001) existed for chemical treatment, with 48.61 cm<sup>2</sup> and protein content ( $p$ -value = 0.0355) the treatment with 75% biol positively influenced protein synthesis, with a value of 6.35 mg / mL. Although there are no highly significant differences for the variables of main root length ( $p$ -value = 0.4248), treatment with 50% of biol present a greater length of the main root of the other treatments.

**Keywords:** Biol, native microorganisms, fermentation, soybean, protein.

EVALUACIÓN DEL CRECIMIENTO Y VALOR NUTRICIONAL DE LA SOYA  
PARA FORRAJE (*Glycine max*) UTILIZANDO BIOL COMO ABONO OBTENIDO  
CON MICROORGANISMOS NATIVOS.

**1.1. Formulación del problema**

Con el propósito de mejorar la producción y rendimiento de cultivos, el uso de fertilizantes químicos en la agricultura ha ido en aumento. Sin embargo, esto ha constituido un problema de contaminación ambiental, así como un daño en la salud de la población expuesta (Pino, 2005). En consecuencia, los cultivos han presentado una mayor susceptibilidad a plagas y enfermedades junto con la muerte de microorganismos benéficos del suelo (Sánchez, 2011).

Un caso representativo es el de la soya (*Glycine max*), que a nivel mundial se produce un promedio de 202'621.534 TM por año, del cual Estados Unidos, Argentina y Brasil representan el 80%. El Ecuador por su parte representa el 0.04%, con una producción al año de 77.441 TM en un área cosechada promedio de 46.618 Ha. Las condiciones agroecológicas favorables de algunos países ha permitido que el rendimiento de soya a nivel mundial haya alcanzado un estimado de 2.3 TM/Ha por año, mientras que en Ecuador el rendimiento ha sido de 1.88 TM/Ha (INEC, 2009).

Actualmente la producción de soya en Ecuador continúa disminuyendo, son solo 30000 Ha las que se dedican al cultivo de esta planta en verano, debido a que las áreas



de cultivo no son aptas y las variedades que existen no contrarrestan la aparición de plagas (El Comercio, 2012).

La soya es una planta que posee buenas propiedades nutricionales y de ahí su importancia en la alimentación, bien sea para personas o animales. Constituye una alternativa para el pastoreo, pues afianza una correcta nutrición del animal al aportar una considerable concentración de proteínas, grasas, carbohidratos, etc. (Martín & Cechetti, 2010).

La importancia de la soya en el pastoreo radica en sus propiedades nutricionales: afianza una mejora en la producción lechera debido a su gran elasticidad ambiental y posee un buen comportamiento durante la estación cálida, pese a que su uso como forraje no es significativo de momento (Martín & Cechetti, 2010).

En Ecuador, durante la última década se ha mantenido constante en el uso de suelos para labores agropecuarias, alcanzando en el 2011 un 47.76% de suelos con cultivos de pastos. Por tal razón, existen alternativas de manejo agrológico de estos terrenos como la rotación de suelos, uso de abonos orgánicos y cultivos, especialmente el fréjol y la soya (Revista Líderes, 2012).

Dado que en el país la actividad agrícola es un factor importante en el ámbito alimenticio y comercial, muchos agricultores han tenido que recurrir al uso de químicos para suplir sus necesidades y las de toda una sociedad, en gran parte a las pobres condiciones del suelo, al desconocimiento de nuevas técnicas amigables con el ambiente

y falta de asesoramiento. El uso inconsciente de agroquímicos ha generado que en los últimos tiempos existan efectos negativos no solo en la salud del productor/consumidor, sino también en el ambiente (Blanco *et al.*, 1999) y, adicionalmente, como consecuencia, los cultivos han presentado una mayor susceptibilidad a plagas y enfermedades junto con la muerte de microorganismos benéficos del suelo (Sánchez, 2011).

Con el propósito de mejorar la producción y rendimiento de cultivos, la utilización de abonos orgánicos han permitido un mejor manejo de los cultivos y un alto rendimiento de los mismos, sin embargo el uso de estos en campo aún es mínimo por la poca difusión y disponibilidad entre los productores (Sánchez, 2011).

Lo que Ecuador está haciendo es crear alternativas biológicas que sean amigables con el ambiente, la salud, que favorezcan los procesos de producción y a su vez que contrarresten la poca fertilidad de suelos. Con herramientas que minimicen el impacto negativo que tienen los fertilizantes químicos. Una de las entidades públicas que se está encargando de capacitar a los agricultores para realizar análisis a los suelos previos a su fertilización es el MAGAP (Freire, 2012).

Con el uso del biol se pretende dar alternativas de manejo a este cultivo, evitar el uso indeseable de elementos tóxicos, además de disminuir costos de producción y optimizar los recursos naturales existentes en el sector dedicado a la práctica agrícola. Es así que los tratamientos que involucran la producción de microorganismos, nativos del suelo para su uso como biofertilizantes (Freire, 2012) han permitido generar sustancias bioactivas beneficiosas para las plantas (Restrepo, 2010).

Los microorganismos nativos constituyen una mezcla de microorganismos benéficos con capacidad de secretar vitaminas, ácidos orgánicos, minerales y antioxidantes, los mismos que han venido siendo idóneos para su aplicación en distintos cultivos (Contino & Ojeda, 2006).

## **1.2. Justificación del problema**

Las técnicas de abonar permiten asegurar la calidad del suelo, mejorar el desarrollo de plantas y de igual manera aportar nutrientes primarios, secundarios y otros utilizados por plantas como la soya. Incentivar al uso de abonos orgánicos en la agricultura facilitará que los suelos suplan sus deficiencias al absorber los distintos elementos nutritivos, así como proteger la salud del ser humano y la biodiversidad (Mosquera, 2010). Estos abonos orgánicos constituyen una buena alternativa para obtener mejores rendimientos de plantas frutales, alimenticias, ornamentales o inclusive madereras.

Con la creciente producción agraria en el país, se ha motivado principalmente al agricultor a usar fertilizantes químicos sobre distintos cultivos para cubrir necesidades nutricionales de los mismos. La soya constituye uno de los cultivos que por requerimientos de mejores condiciones del suelo, mejor rendimiento y de sus escasas variedades en la actualidad, sea poco cultivada. Algunas investigaciones indican que los sembríos tratados con abonos químicos no solo son perjudiciales para la salud, sino que provocan una seria contaminación del suelo y agua. Al momento de tratar cultivos con fertilizantes, químicos lo que se logra es perjudicar la cobertura vegetal y alterar también las vitaminas y nutrientes que contiene el suelo (Mosquera, 2010).

La principal importancia del uso del biol radica en que es una fuente de vida bacteriana para el suelo, posibilita la degradación de nutrientes del suelo y permite que las plantas los asimilen mejor ayudando a un óptimo desarrollo de los cultivos (Mosquera, 2010).

El biol, al ser un abono líquido, tiene la capacidad de aumentar el calor en el suelo y favorecer el desarrollo de raíces, la vía principal de nutrición de plantas. Su uso es recomendable para toda clase de suelos, especialmente para aquellos de bajo contenido en materias orgánicas, desgastados por efectos de la erosión y su utilización contribuye a regenerar suelos para la agricultura (Mosquera, 2010).

En la agricultura, el uso de los microorganismos está enfocado al mejoramiento de la calidad del suelo, posibilitando tener una microflora equilibrada con la mayoría de microorganismos benéficos y, como consecuencia, las plantas al tener un ambiente propicio podrán incrementar la resistencia a enfermedades e inclusive mejorar el rendimiento y calidad de los productos resultantes del cultivo, lo que encierra que tengan una mejor apariencia, valor nutricional, sabor y/o una vida más larga (EMPROTEC, 2005).

Puesto que las plantas de soya requieren de mejoras de las condiciones físicas, químicas y biológicas del suelo para lograr excelentes resultados productivos, lo que se propone es la aplicación de biol, el mismo que se obtendrá por la intervención de organismos de diferentes tipos, cuya acción sobre el suelo estimulará la nutrición de muchos organismos y la producción de ciertos nutrientes útiles para las plantas.

En la literatura, no se han encontrado estudios sobre el efecto que presenta el biol elaborado con microorganismos nativos sobre cultivos de soya en el Ecuador. Ésta investigación propone obtener un biol con microorganismos nativos del suelo para aprovechar sus capacidades fermentativas y la producción de metabolitos que permitirán a los cultivos de soya para suplir sus necesidades nutricionales y acelerar su crecimiento. Consecuentemente a partir del uso de este biol, se garantizará un ambiente inocuo ofreciendo una técnica amigable con el ambiente sin repercutir en daños a terceros, asimismo que las plantas de soya aporten buenas propiedades nutricionales.

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

#### **1.3.1. Objetivo general**

Evaluar el crecimiento y el valor nutricional de la soya para forraje (*Glycine max*) utilizando biol como abono obtenido con microorganismos nativos.

#### **1.3.2. Objetivos específicos**

- Obtener un inóculo de los microorganismos nativos a emplearse en la producción de biol, de suelos con cultivos de soya para forraje (*Glycine max*).
- Producir a escala de laboratorio los microorganismos nativos seleccionados.
- Obtener biol en biodigestores con los microorganismos nativos.
- Analizar química y microbiológicamente el biol obtenido.

- Evaluar a nivel de campo, el crecimiento de la soya para forraje (*Glycine max*) cultivada, utilizando varios tratamientos de biol como abono.
- Evaluar a nivel de laboratorio, el valor nutricional de la soya para forraje (*Glycine max*) cultivada utilizando varios tratamientos de biol como abono.

## **1.4. Marco teórico**

### **1.4.1. Biofertilizante**

El biol es un abono orgánico líquido producido a partir de la descomposición de materias vegetales y animales, conteniendo principalmente nutrientes que son asimilados por las plantas (Solari, 2011).

Los productos obtenidos de la degradación y mineralización cuentan con mucha energía equilibrada y sirven para nutrir, recuperar y reactivar la vida del suelo, fortalecer la vida de plantas y salud de animales, estimular la protección de cultivos contra el ataque de insectos y enfermedades ( Restrepo, 2009; Freire, 2012).

Los biofertilizantes resultan más sencillos de obtener porque requieren de menor cantidad de insumos respecto a la cantidad de productos obtenidos, siendo más fácil de transportarlos y aplicarlos en campo (Robalino, 2011). Son preparados a partir de fermentaciones de materiales orgánicos como el estiércol de animales, plantas verdes, frutos, melaza y suero de leche, en la cual su eficiencia se debe a la intensa actividad de

los microorganismos disponibles en el suelo (Delgado, 2006; Ferrufino, 2007). El estiércol es usado para aprovechar su contenido de fósforo y nitrógeno aunque es bajo en comparación con el contenido disponible en los fertilizantes comerciales (Brady & Weil, 1999).

Por otra parte, constituyen una fuente orgánica de fitorreguladores como auxinas y giberelinas que ayudan en las actividades fisiológicas y a estimular el crecimiento de una gran variedad de plantas, favoreciendo en ellas el enraizamiento, mejorando la floración y activando el vigor y poder germinativo de las semillas, traduciéndose en un aumento significativo de las cosechas (Gomero, 2005).

Sin embargo, en la mayoría de casos, el proceso de elaboración de biol no está estandarizado, por tal razón existe una variabilidad en los productos finales. Debido a que emplean excretas de animales que pueden presentar agentes contaminantes, que deberán ser tratados adecuadamente, ya que pueden ser altos contenidos de nitrógeno y/o presencia de microorganismos patógenos como *Salmonella*, *Shigella*, *Campylobacter*, *Vibrio cholerae* y *Escherichia coli* (Ito, 2006).

En el Ecuador existen varias experiencias exitosas sobre el uso de biol en diversos cultivos como banano, cacao, arroz. Los resultados son exitosos a criterio de los productores que los utilizan y se evidencian en mejor tolerancia al ataque de plagas, resistencia a enfermedades e incrementos de rendimiento en cuanto a producción (Robalino, 2011).

#### **1.4.1.1. Composición del biol**

La actividad microbiana es muy dinámica dentro de los biodigestores y, por ende, a través del tiempo se puede evidenciar variaciones en la composición química del biofermento, pese a utilizar las mismas fórmulas e insumos. Esto está asociado fuertemente a lo variable que resulta la composición bioquímica y microbiológica de sus ingredientes, especialmente de los estiércoles (Robalino, 2011).

Según Ito (2006), los ingredientes básicos que se encuentran en los biofertilizantes son: el estiércol, donde el bovino es el más utilizado por ser rico en nitrógeno, fósforo y potasio, también el suero de leche o leche cruda ya que poseen microorganismos lácteos que funcionan como controladores de pH y cumplen una función importante en el proceso de fermentación y la melaza que provee de energía a los microorganismos ruminales ayudando en la aceleración del proceso de fermentación.

El biol está compuesto mayormente por ácidos húmicos, fúlvicos, huminas y, en otra pequeña cantidad, por hidratos de carbono, glucósidos, sustancias de naturaleza fenólica, ácidos urónicos y ácidos orgánicos nitrogenados. Los ácidos húmicos son ácidos polibásicos conformados por grupos carboxílicos, fenólicos, alcohólicos y metoxílicos (OCH<sub>3</sub>). Los ácidos fúlvicos se diferencian de los húmicos porque son más claros por el bajo contenido de carbono, mientras que las huminas son un grupo de sustancias que representan en sí ácidos húmicos (Delgado, 2006).



Gomero (2005), para el análisis en la variación bioquímica, analizó la composición de dos tipos de biol: 1) elaborándolo con estiércol de ganado lechero estabulado, que recibe en promedio una ración diaria de 60% alfalfa, 30% de maíz ensilado y 10% de alimentos concentrados y 2) empleando el mismo estiércol de ganado lechero estabulado, sometido a la misma ración alimenticia pero añadiéndole alfalfa picada (tabla 1.1). Esto con la finalidad de comprobar la variabilidad en cuanto a la composición de cada biol.

**Tabla 1.1:** Análisis bioquímico de biofermentos elaborados con estiércol y estiércol junto con alfalfa picada.

<b>Componentes</b>	<b>Unidad</b>	<b>Biol elaborado con estiércol (1)</b>	<b>Biol estiércol + alfalfa (2)</b>
Sólidos totales	%	5.6	9.9
Materia orgánica	%	38.0	41.1
Fibra	%	20.0	26.2
Nitrógeno	%	1.6	2.7
Fósforo	%	0.2	0.3
Potasio	%	1.5	2.1
Calcio	%	0.2	0.4
Azufre	%	0.2	0.2
Ácido indolacético	ug/g	12.0	67.1
Giberelinas	ug/g	9.7	20.5
Purinas	ug/g	9.3	24.4
Tiamina (B1)	ug/g	187.5	302.6
Riboflavina (B2)	ug/g	83.3	210.1
Piridoxina (B6)	ug/g	33.1	110.7
Ácido nicotínico	ug/g	10.8	35.8
Ácido fólico	ug/g	14.3	45.6
Cisteína	ug/g	92.0	27.4
Triptofano	ug/g	56.6	127.1

Fuente: Gomero, 2005.

Además se pueden enriquecer con diferentes sales o rocas molidas de acuerdo a las necesidades específicas de cada cultivo o etapa de cultivo. De igual manera existen

fórmulas y combinaciones de ingredientes que resultan en biofermentos diferentes (Robalino, 2011).

#### **1.4.2. Digestión anaeróbica**

La digestión anaeróbica es un proceso biológico que consta, a su vez, de una serie de procesos para la degradación de materia orgánica en ausencia de un aceptor de electrones, como el oxígeno libre, obteniéndose como productos finales al metano y dióxido de carbono principalmente y, en menor cantidad, a otros tipos de gases, quedando como remanente una forma de materia orgánica estabilizada, el biofertilizante (Mejía, 1996; Frioni, 1999).

En la fermentación anaeróbica algunos compuestos iniciales son oxidados y otros reducidos, en este caso las levaduras existentes en el biofermento oxidan la glucosa de la melaza en ausencia de oxígeno (Delgado, 2006):



Glucosa → Etanol + Dióxido de carbono + Energía (Sale del carbón oxidado)

El proceso de las fermentaciones anaeróbicas inicia con la hidrólisis de largas cadenas de estructura carbonatada, transformándolas en cadenas cortas más simples (ácidos orgánicos) y liberando H<sub>2</sub> y CO<sub>2</sub>; en esta fase actúan mayoritariamente bacterias anaerobias facultativas. Posteriormente le sigue la acetogénesis generando acetato, H<sub>2</sub> y

CO<sub>2</sub>. Finalmente en la metanogénesis actúan bacterias primitivas (arqueobacterias) que utilizan como sustrato el ácido acético junto con otros ácidos orgánicos de cadena corta, donde los subproductos finales son el CH<sub>4</sub> y el CO<sub>2</sub> (Carrillo, 2003).

Un aspecto importante es saber diferenciar las fermentaciones de acuerdo a su objetivo final. Delgado (2006) manifiesta que en los casos donde el objetivo primordial es la obtención de metano (biogás), las bacterias metanogénicas son las más importantes, por tanto se deberá ofrecer un ambiente con las mejores condiciones para su multiplicación y crecimiento (pH alto). Cuando lo que se quiere es obtener un biofertilizante agrícola de alta eficacia, este debe ser rico en ácidos orgánicos y monómeros (azúcares, aminoácidos, etc.), por lo que es primordial la multiplicación de las bacterias hidrolíticas y fermentativas, las cuales actúan en las primeras dos etapas del proceso (hidrólisis y acidogénesis).

### **1.4.3. Etapas de la fermentación anaeróbica**

#### **1.4.3.1. Hidrólisis y acidogénesis**

Se encuentran las bacterias anaerobias facultativas como las enterobacterias, las aerotolerantes como las del ácido láctico que producen ácido láctico, a veces etanol y dióxido de carbono a partir de azúcares y bacterias anaerobias estrictas como *Clostridium*, *Bacteroides*, *Propionibacterium*, esta última puede fermentar ácido láctico con liberación de H<sub>2</sub> y acetato o acetato y propionato (Frioni, 1999).

Frioni (1999), afirma que en la fermentación anaeróbica las bacterias del género *Bacillus* juegan un papel importante durante la fase de hidrólisis y acidogénesis, siendo productoras activas de ácidos orgánicos útiles para las plantas y para los posteriores procesos.

#### **1.4.3.2. Acetogénesis**

Las encargadas de llevar a cabo esta etapa, son un tipo de bacterias sintróficas obligadas, caracterizadas por su imposibilidad de crecer en un cultivo puro, necesitan asociarse con microorganismos consumidores de  $H_2$  para oxidar sustratos naturales como ácidos grasos saturados, etanol y benzoato. Pertenecen a géneros diversos como *Acetobacterium*, *Acetogenium* y *Clostridium* (Frioni, 1999). En la mayoría de ecosistemas anóxicos, la acetogénesis limita el proceso global porque la velocidad de crecimiento de los microorganismos intervinientes es generalmente muy lenta (Carrillo, 2003).

Actúan también en el proceso las bacterias sulforeductoras que ejercen un rol importante como acetogénicas deshidrogenantes. Otro grupo a considerar, son las bacterias desnitrificantes que obtienen energía de compuestos orgánicos, compuestos de azufre reducidos y  $H_2$ , con nitratos como aceptores finales de electrones. El género más común es *Pseudomonas*, que junto con las enterobacterias, remueven oxígeno del sistema (Frioni, 1999).

### **1.4.3.3. Metanogénesis**

En esta etapa, las bacterias son anaerobias estrictas y requieren concentraciones de oxígeno menores de 5ppm en cultivos puros (Frioni, 1999). Las procariotas reductores de CO<sub>2</sub> más importantes son los metanógenos, un grupo de arqueobacterias que emplean generalmente el H<sub>2</sub> como donante de electrones. En muchos ambientes anóxicos, los precursores inmediatos del metano son el H<sub>2</sub> y el CO<sub>2</sub> que se generan por las actividades de los organismos fermentadores (Carrillo, 2003).

Todos los metanógenos utilizan NH<sup>+</sup> como fuente de nitrógeno, así mismo, tanto el amoníaco como el azufre resultan tóxicos a niveles superiores de 100 y 150 mg/L respectivamente, siendo sensibles a sustancias tóxicas como sales de metales pesados, detergentes, desinfectantes y antibióticos (Frioni, 1999).

### **1.4.4. Factores que intervienen en las fermentaciones**

#### **1.4.4.1. pH**

En digestores operados con estiércol bovino, los valores óptimos de operación oscilan entre 6.7 y 7.5 con límites de 6.5 a 8.0 (Carrillo, 2003). El gas producido de la digestión anaerobia tiene un pH entre 6.5 y 7.5, el mismo que se podría mantener solo si el biodigestor está en correcto funcionamiento. Una carga excesiva, dejar mucho tiempo sin carga al biodigestor, presencia de elementos tóxicos y un cambio brusco de

temperatura conllevan a un aumento de pH causando la inhibición de la acción de las bacterias metanogénicas produciendo un gas carbónico en el biogás (Robalino, 2011).

El pH se incrementa en el proceso por la acumulación de amonio durante la degradación de proteínas, mientras que la acumulación de ácidos grasos volátiles produce reducción del pH y en altas concentraciones pueden inhibir la metanogénesis. El ácido acético se presenta generalmente en mayor proporción respecto a los demás ácidos orgánicos pero los ácidos butírico y propiónico son más efectivos en cuanto a inhibición de las metanogénesis. La acción inhibitoria de los ácidos orgánicos es mayor en sistemas de pH bajo (Weiland, 2009).

Robalino (2011), manifiesta que durante el proceso de producción de biogás se pierde gran cantidad de ácidos orgánicos y biomoléculas útiles para las plantas cuando el pH es alto, por otro lado cuando se realizan biofermentos agrícolas ricos en ácidos orgánicos y biomoléculas (pH entre 3,5 y 4) la producción de metano es reducida.

#### **1.4.4.2. Relación C/N**

La relación óptima de C/N es de 30:1, cuando es muy estrecha esta relación (10:1) hay pérdidas de nitrógeno asimilable, lo cual reduce la calidad del material digerido. Si la relación es muy amplia (40:1), se inhibe el crecimiento por la falta de N (Robalino, 2011).

El nitrógeno es el elemento utilizado para la multiplicación bacteriana y como catalizador en el proceso de producción de biogás. Cuando su nivel es alto, el proceso se retarda por el exceso de amoníaco y por la alcalinización de la fase líquida, pudiéndose llegar a detener tal proceso (Robalino, 2011). Para el crecimiento y sobrevivencia de varios grupos de microorganismos son necesarios algunos macro y micro nutrientes. Los macronutrientes necesarios son el carbono, nitrógeno, fósforo y azufre. Una baja generación de biomasa disminuye la necesidad de nutrientes, por tanto una relación de C:N:P:S que corresponda a 600:15:5:1 suele ser suficiente en la mayoría de casos para la supervivencia de los microorganismos (Weiland, 2009).

#### **1.4.4.3. Otros factores**

Algunos microelementos son necesarios para estimular el proceso de producción de biogás como el hierro, níquel, cobalto, selenio, molibdeno y tungsteno. El níquel es necesario para la síntesis del cofactor  $F_{430}$ , el cual es involucrado en la formación de metano. La función del selenio, molibdeno y tungsteno no está muy clara. La concentración de micronutrientes es muy baja con un rango entre 0.05 y 0.06mg/L. Solo el hierro es necesario en mayor concentración entre 1 y 10 mg/L (Weiland, 2009).

#### **1.4.5. Inocuidad y calidad de los fermentos**

La inocuidad se define como el atributo de un objeto o sustancia de no causar daño o de no producir efectos negativos sobre la salud humana. Los principales riesgos de los fertilizantes orgánicos fermentados son la presencia de microorganismos patógenos

(*Escherichia coli*, *Salmonella* spp, *Shigella* spp., etc.) y el contenido de metales pesados (cadmio, cromo, cobre, mercurio, níquel, plomo, arsénico, selenio, zinc, etc.). Los límites máximos de poblaciones de coliformes fecales para compost según criterios de la Environmental Protection Agency (EPA) son *Escherichia coli* y *Shigella* < 1,000 NMP/g; y *Salmonellas* pp., < 3 NMP/g en abonos de biosólidos (Ito, 2006).

El óptimo pH para el desarrollo de las bacterias patogénicas del género *Salmonella* spp., es de 6,2 a 7,2. Para prevenir el desarrollo de dicha bacteria patogénica y la recontaminación, el material digerido resultante debería ser esterilizado. Una opción a la esterilización, es mantener el pH del tanque lo suficientemente ácido para inhibir el desarrollo de *Salmonella* spp; lo que ocasionaría una reducción en la emisión de metano y la consiguiente disminución de los subproductos generados en la hidrólisis, fermentación y acidogénesis (ácidos orgánicos, azúcares, aminoácidos, H<sub>2</sub>, etc.), que quedarían en el medio y resultarían muy beneficiosos al aplicarlos en plantas (Robalino, 2011).

#### **1.4.6. Microorganismos nativos**

En la agricultura los microorganismos nativos son los responsables del mejoramiento de las propiedades fisicoquímicas de los suelos y de la nutrición de los cultivos. Constituyen un cultivo mixto de microorganismos benéficos que deben encontrarse en concentraciones superiores a 100.000 unidades formadoras de colonias por mililitro de solución (Contino & Ojeda, 2006; Wenzl, 2006).



Restrepo (2010) manifiesta que la función de los microorganismos en la elaboración del biofermento consiste en tomar las sustancias orgánicas y sustancias generadas por otros microorganismos para basar en ellas su funcionamiento y desarrollo. Estos microorganismos benéficos secretan sustancias como las vitaminas, ácidos orgánicos, minerales y antioxidantes al contactar con la materia orgánica (Contino & Ojeda, 2006).

Los microorganismos empleados en la elaboración de biol constituyen las levaduras (*Saccharomyces* spp.), bacterias ácido lácticas (*Lactobacillus* spp.) y bacterias fermentadoras (*Aeromonas* spp.), los cuales presentan buenas propiedades en la fermentación y degradación de elementos. Estos microorganismos se pueden utilizar en un medio a base de azúcar (melaza o la azúcar cruda) con un pH bajo (3 - 4) y tienen la capacidad de usar las sustancias causantes de la putrefacción por lo que evitan los malos olores y las enfermedades al eliminar muchos de los patógenos a través de la exclusión competitiva (Contino & Ojeda, 2006).

#### **1.4.6.1. *Saccharomyces* spp.**

La levadura *Saccharomyces* es un tipo de hongo unicelular con fase sexual teleomorfa que pueden o no presentar pseudohifas. Por su capacidad de formar ascosporas, se encuentra incluida en la división Ascomycota, se pueden encontrar formando parte de la microbiota normal de los organismos vivos y, por lo general, no causa patogenicidad al huésped a menos que sea numerosa y en conjunto con otro tipo de levaduras (Mendoza, 2005).

Según Gómez & Tovar (2008), las levaduras sintetizan sustancias antimicrobianas útiles, a partir de aminoácidos y azúcares procedentes de la materia orgánica, mientras que las bacterias ácido lácticas utilizan azúcares y otros carbohidratos sintetizados por las levaduras para producir ácido láctico, el cual es un fuerte esterilizador que suprime la proliferación de microorganismos patógenos y acelera la descomposición de la materia orgánica, evitando la putrefacción y generación de malos olores.

El proceso de fermentación puede estar regulado por levaduras que habitan en ríos, lagos y alimentos, debido a que ciertos géneros como *Saccharomyces*, *Candida*, *Cryptococcus*, *Debaryomyces*, *Hanseniaspora*, *Kluyveromyces*, *Pichia*, *Willopsis* y *Zygosaccharomyces* presentan una “actividad killer” que les permite secretar proteínas o glicoproteínas tóxicas para otras cepas sensibles de diferentes especies (Arriata, 2009).

De acuerdo a estudios llevados por Mekki & Ahmed (2005), el uso de levaduras en la fertilización de plantas de soya ayudó a aumentar su producción, así mismo constataron que aplicando solamente levaduras y la mezcla de fertilizantes con levaduras, se incrementaron fósforo (P), magnesio (Mg), hierro (Fe) en la planta.

#### **1.4.6.2. *Lactobacillus spp.***

*Lactobacillus* es una bacteria ácido láctica perteneciente al grupo de las Gram positivas no esporuladas, presentan la propiedad de producir ácido láctico como producto terminal de la fermentación de carbohidratos. Estas bacterias no son patogénicas y se consideran anaerobias facultativas, pero requieren de condiciones

anaerobias para descomponer residuos orgánicos ricos en carbohidratos. Pueden crecer en altas temperaturas (65-85°C) y pH ácido, también trabajar en conjunto con especies de levaduras como *Saccharomyces* spp. y *Schizosaccharomyces* spp. (Matsui, 2010; Mayo *et al.*, 2010).

Las bacterias ácido lácticas son encontradas en la leche, productos lácteos, vegetales, plantas, cereales y en productos cárnicos. Muchas de estas especies se emplean como preservantes de alimentos fermentados y pueden residir en el tracto gastrointestinal (Mayo *et al.*, 2010).

Como fertilizante ayudan a proteger los productos agrícolas al presentar la capacidad de repeler gusanos, insectos y algunos nemátodos, pero durante la fermentación del ácido láctico se produce un descenso del pH causando efectos inhibitorios en el crecimiento celular y por ende en la producción del ácido láctico, por tanto se requiere que estos procesos de elaboración de fertilizantes lleven adicionados productos químicos ( $\text{CaCO}_3$ , NaOH o  $\text{NH}_4$ ) para neutralizar el medio (Ishida *et al.*, 2005; Matsui, 2010).

#### **1.4.6.3. *Aeromonas* spp.**

Las *Aeromonas* son bacterias del grupo Gram negativo, Estudios han determinado que existen alrededor de 14 genoespecies (especie con múltiples grupos de DNA) de *Aeromonas* aisladas, y están relacionadas con la fermentación de ciertos carbohidratos como glucosa, xilosa y manitol en la mayoría de estas (Abbott *et al.*, 2003).

Pueden encontrarse en el suelo, superficies de aguas e inclusive en el agua para beber, se lo ha catalogado como un patógeno oportunista que puede llegar a tener efectos negativos en huéspedes inmunodeprimidos (Burke *et al.*, 1984). Las cepas bacterianas que pueden crecer de 35 a 37°C (mesófilas) están relacionadas con las causantes de infecciones en humanos, mientras que las que crecen a bajas temperaturas de 22 a 28°C (psicrófilas) están relacionadas con afecciones en peces (Janda & Abbott, 1998).

En cuanto a sus ventajas, este tipo de bacterias han venido siendo utilizadas para la degradación de compuestos de amonio cuaternario como BAC (Patrauchan & Oriol, 2003), descomposición y asimilación de lignina (Deschamps *et al.*, 1980), tratamiento de efluentes industriales con altas concentraciones de fertilizantes nitrogenados (Hazen & Esch, 1982), entre otros, su uso en la elaboración de fertilizantes aún es desconocida.

#### **1.4.7. Beneficios de los microorganismos como biofertilizantes**

Los microorganismos presentan muchos beneficios en el suelo, sea generando un cambio en su microbiología creando un ambiente agradable, permitiendo que las plantas crezcan fácilmente o bien propiciando un mejor escenario para la salud de los trabajadores del campo (Contino & Ojeda, 2006).

Tienen efectos positivos en la crianza y explotación animal al solucionar los problemas del mal olor, la mejora en la calidad de las carnes y el tratamiento de residuales orgánicos provenientes de basureros domésticos. En la industria pesquera constituyen una alternativa para los tratamientos químicos y desinfectantes; de igual

manera en el tratamiento del agua y la reducción de la basura industrial (Contino & Ojeda, 2006).

El potencial de los microorganismos en la agricultura, la ganadería y la protección medio ambiental es cada día más relevante. Su utilización es fácil, aplicable, económicamente justificada y amigable para el hombre y el ambiente, cuyo fin principal es mejorar la productividad de los sistemas agrícolas y ganaderos, especialmente los sistemas orgánicos, con la premisa de mitigar la contaminación ambiental (Contino & Ojeda, 2006).

#### **1.4.8. Generalidades de la soya**

La soya o llamada también soja, es una de las leguminosas de ciclo anual más estudiadas por sus amplios usos en la alimentación humana y animal. Constituye una principal fuente de proteína vegetal y un componente importante de alimentos balanceados para la nutrición animal. Su uso se remonta a principios del siglo XIX al ser introducida en EEUU como forraje para la alimentación de cabras y cerdos, siendo las variedades de elevados rendimiento en grano las mejores opciones en la producción de forraje y silajes de buena calidad (Tobía *e al.*, 2006).

El nombre científico es *Glycine max*, pertenece a la familia de las *Papilionáceas* (*Fabáceas*), es una planta que puede alcanzar alturas de 0.5 a 1.5 m, la semilla se produce en vainas cortas y cada una contiene de 2 a 4 granos (con 20% de aceite). Los cultivos de esta planta se desarrollan mejor en climas cálidos y tropicales, obteniéndose

mejores resultados a menos de 1000 msnm, además son muy sensibles a la luz, por tal razón la radiación solar controla la transformación del periodo vegetativo al de floración y afecta también a la velocidad de crecimiento durante su maduración (Ridner, 2006; Fenalce, 2010).

Otro punto importante a tomar en cuenta en este tipo de cultivos, es la temperatura, la misma que puede oscilar entre 26-34°C diurnos y 22-30°C nocturnos para que la tasa de desarrollo de esta planta sea más rápida y haya una correcta estimulación del crecimiento vegetativo, así mismo la falta de hidratación y la deficiencia de nutrientes prolongan la etapa vegetativa y acortan el tiempo de reproducción (Román, 2012).

#### **1.4.9. Calidad de la soya**

La soya destaca por su alto contenido proteico y de ácidos grasos (linoleico y alfa-linolénico, junto a la vitamina E), de los cuales estos últimos ocupan más del 60 % del total (Díaz *et al.*, 2003). La composición del grano en promedio es de 36.5% de proteínas, 20% de lípidos, 30% de hidratos, 9% de fibra alimentaria, 8.5% de agua y 5% de cenizas (Ridner, 2006).

El valor nutricional de la soya se determina a partir de la calidad de los nutrientes que consigan del medio en que se desarrollen y estos deberán cubrir por ende todas las necesidades energéticas de la planta. La mejor manera de conocer el valor nutritivo de los forrajes es por medio de los análisis bromatológicos para determinar los porcentajes

de humedad, proteína, fibra, extracto etéreo y elementos libres de nitrógeno y finalmente con esta información cubrir las deficiencias nutritivas de los forrajes (Freire, 2012).

De acuerdo a investigaciones realizadas por Díaz *et al.* (2003) en cuatro variedades de soya (Duocrop, Cubasoy 23, INCASOY 24 e INCASOY 27), demuestran que la composición bromatológica de la soya con fines forrajeros para las variedades Cubasoy 23 e INCASOY 27 fue superior en proteína bruta (PB) y fibra neutro detergente (FND), mientras que Duocrop obtuvo valores altos de Mg y K (tabla 1.2).

**Tabla 1.2:** Caracterización bromatológica de los forrajes, %.

Variedades	PB	FND	FAD	Lignina	P	Mg	K
Duocrop	19.88 <sup>ab</sup>	53.55 <sup>b</sup>	42.80	10.07	0.32	0.92 <sup>a</sup>	1.72 <sup>a</sup>
INCASOY24	16.32 <sup>b</sup>	55.93 <sup>b</sup>	42.03	9.20	0.37	0.94 <sup>a</sup>	1.13 <sup>b</sup>
INCASOY27	20.01 <sup>ab</sup>	58.31 <sup>a</sup>	43.75	10.34	0.34	0.75 <sup>c</sup>	1.26 <sup>b</sup>
Cubasoy 23	21.74 <sup>a</sup>	56.82 <sup>ab</sup>	41.49	9.65	0.35	0.86 <sup>b</sup>	1.06 <sup>b</sup>
EE ±	1.12*	0.97*	1.04	0.37	0.03	0.01***	0.11*

<sup>abc</sup>Medias con letras diferentes dentro de cada columna difieren a P<0.05, \*P<0.05  
\*\*\*P<0.001

Fuente: Díaz *et al.*, 2003.

#### 1.4.9.1. Proteína

La soya contiene principalmente aminoácidos esenciales, los cuales son componentes elementales de las proteínas y carece de compuestos purínicos por lo que no hay lugar para la formación del ácido úrico. Las proteínas vegetales tienen un bajo nivel de aminoácidos que contienen azufre (cisteína y metionina). En la tabla 1.3 se detalla el contenido de aminoácidos presentes en la soya. La proteína en laboratorio no

se mide como tal, sino que se analiza en base a la cantidad de nitrógeno, existiendo un 16% en promedio en su composición (Freire, 2012).

**Tabla 1.3:** Aminoácidos de la soya.

<b>Perfil de aminoácidos (aa)</b>	<b>% de aa/100g de proteína</b>	<b>Perfil de aminoácidos (aa)</b>	<b>% de aa/100g de proteína</b>
Triptófano	1.01	Isoleucina	4.77
Lisina	5.05	Leucina	8.13
Histidina	1.16	Tirosina	1.68
Arginina	10.95	Fenilalanina	4.21
Ácido aspártico	13.95	Prolina	5.61
Treonina	6.88	Glicina	3.52
Serina	4.19	Alalina	2.84
Ácido glutámico	18.53	Valina	5.08

Fuente: Saltos, 2009.

Para el caso de la proteína bruta (PB) se incluyen sustancias nitrogenadas no proteicas (NNP) como aminos, amidas, urea, nitratos, péptidos y aminoácidos aislados. No siempre un alto nivel de PB significa buen nivel proteico. Los compuestos NNP, solubles o muy degradables, poseen menor valor nutricional que las proteínas verdaderas (Gallardo, 2008).

### **1.5. Hipótesis**

El empleo de biol como abono incrementa en forma significativa tanto el crecimiento como el valor nutricional de la soya para forraje (*Glycine max*).



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

### **2.1. Participantes**

En el presente estudio participaron como directora, Alma Koch Kaiser, MC. y como codirector el Ing.-Mat. Pedro Romero Saker, docentes de la carrera de Ingeniería en Biotecnología y en calidad de tesista, Vanessa Maribel Abad Valarezo.

### **2.2. Zona de estudio**

La fase de campo fue llevada a cabo en la quinta “Winchele” de la ciudad de Esmeraldas, ubicada geográficamente a 0°N, 79°W, donde se recolectaron las muestras de suelo para obtener los microorganismos nativos de interés, se elaboró y se aplicó el respectivo biol en plantas de soya para forraje (*Glycine max*).

La fase de laboratorio fue desarrollada en el Laboratorio de Biotecnología de la Universidad de las Fuerzas Armadas-ESPE, Ecuador, Provincia de Pichincha, Cantón Rumiñahui, Sangolquí, ubicación geográfica: 0° 18' 53'', 52° S, en donde se llevó a cabo el aislamiento y reproducción de los microorganismos, así como también la realización de los análisis microbiológicos y del valor nutricional de plantas cultivadas con el biol producido.

### 2.3. Período de tiempo de investigación

La presente investigación se inició en junio del 2013 y finalizó en diciembre del 2013, con un periodo de duración de 6 meses.

### 2.4. Diseño

Las muestras de suelo tomadas en diferentes puntos identificados como sectores potenciales de crecimiento de los microorganismos nativos no fueron parte del análisis estadístico, porque se emplearon para la obtención y selección de los microorganismos nativos en la preparación de biol.

En la elaboración del biol se utilizó un diseño completamente al azar (DCA) en el que se evaluaron diferentes composiciones de biol (tabla 2.1), sobre el volumen final en cada biodigestor y la supervivencia de los microorganismos nativos de interés. Del diseño planteado se realizaron cinco repeticiones de cada tratamiento.

**Tabla 2.1:** Tratamientos en la fase de elaboración de biol.

Tratamiento	Composición
T1	Biol con <i>Aeromonas</i>
T2	Biol con <i>Lactobacillus</i>
T3	Biol con <i>Saccharomyces</i>
T4	Biol con solución madre

Para la fase experimental desarrollada en campo, se empleó un diseño en bloques completamente al azar (DBCA), en el que se investigó el efecto de diferentes dosis del

biol (tabla 2.2), sobre el crecimiento y valor nutricional de la soya para forraje (*Glycine max*), de este diseño se efectuaron 10 repeticiones para cada tratamiento.

**Tabla 2.2:** Tratamientos en la fase de elaboración y aplicación.

<b>Tratamiento</b>	<b>Composición</b>	<b>[Biol] (%)</b>
T1	Biol seleccionado	25
T2	Biol seleccionado	50
T3	Biol seleccionado	75
T4	Fertilizante químico	-
T5	Testigo (agua)	-

Los resultados obtenidos se analizaron en el programa estadístico InfoStat, tanto de los datos recogidos del volumen de biol producido de las diferentes composiciones, así como los datos recogidos de las variables de crecimiento y valor nutricional. Para determinar la dosis de biol a emplearse en las plantas de soya para forraje (*Glycine max*) se partió de estudios previos realizados en campo por el CICYT (2005).

## **2.5. Procedimiento**

A nivel de laboratorio, la investigación abarcó tanto el aislamiento de los microorganismos nativos como el análisis del valor nutricional de la soya para forraje (*Glycine max*) en donde se cuantificaron los valores proteicos de los cultivos. En campo se llevó a cabo la elaboración del biol y su aplicación en cultivos de soya.

### 2.5.1. Recolección de muestras

El muestreo se realizó en la quinta “Winchele” de la ciudad de Esmeraldas en distintos puntos del sector. Las muestras recolectadas fueron almacenadas en recipientes estériles para su posterior análisis.

Para la colocación de las trampas de microorganismos se seleccionaron los sitios donde la tierra no estaba muy sensible al sol ni a la lluvia, por tanto se escogieron los árboles más grandes para colocar las trampas al pie de los mismos. Para ello se preparó 0.5 Kg de arroz cocinado sin sal mezclado con 0.5 L de melaza y se distribuyó en cinco tarrinas de plástico que fueron cubiertas con nylon y enterradas a 15 cm de profundidad del suelo (figura 2.1), procurando que la trampa quedase cubierta por la misma tierra por un lapso de tres semanas. Al concluir el periodo de fermentación, se elaboró una solución madre a partir de cada muestra de la trampa de microorganismos, mezclando 0.1 L de agua hervida y 0.1 L de melaza durante 1 min, finalmente se filtró la mezcla para eliminar la parte gruesa (Toalombo, 2012).



**Figura 2.1:** Trampas de microorganismos colocadas en la quinta “Winchele”.

Asimismo se tomaron muestras de tierra de los sitios donde se colocaron las trampas de microorganismos para complementar las pruebas de aislamiento.

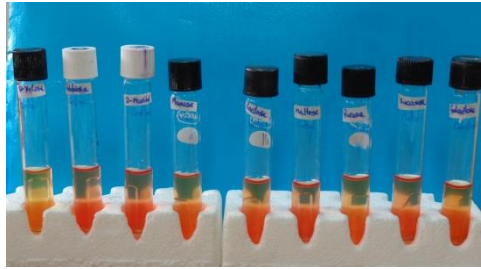
### **2.5.2. Obtención del inóculo de microorganismos**

La obtención se realizó mediante la inoculación de la solución madre sobre medios de cultivos específicos con la finalidad de aislar los microorganismos de interés, los medios fueron preparados periódicamente. La siembra se realizó mediante estrías donde las mejores colonias se separaron y se empleó la tinción Gram para llevar a cabo la diferenciación morfológica, así como también pruebas bioquímicas para verificar la existencia de los microorganismos de interés.

#### **2.5.2.1. Aislamiento de *Saccharomyces* spp**

Para la obtención de las levaduras *Saccharomyces*, se realizó la siembra directa de la solución madre sobre agar papa dextrosa (PDA) con cloranfenicol para inhibir el crecimiento de bacterias (anexo A) y se incubaron las placas por 24 horas a 35°C.

Para la identificación, se empleó la técnica propuesta por Linares (2007), la misma que consistió en realizar pruebas en medios selectivos y fermentación de carbohidratos como se observa en la figura 2.2 (anexo B). Asimismo, para corroborar datos se realizó la prueba API 20 AUX (anexo M) para determinar la levadura presente.



**Figura 2.2:** Pruebas de fermentación de carbohidratos para identificación de *Saccharomyces*.

#### **2.5.2.2. Aislamiento de *Lactobacillus* spp.**

Para la obtención de *Lactobacillus*, se realizó la siembra de la solución madre en MRS agar (anexo C) para permitir su crecimiento y finalmente se incubaron a 35 °C por 48 h (BD, 2003).

La prueba API CHL 50 (anexo M) se llevó a cabo para identificar a esta bacteria, también se empleó la tinción Gram para constatar su morfología y la tinción verde de malaquita para descartar bacterias formadoras de esporas.

#### **2.5.2.3. Aislamiento de *Aeromonas* spp.**

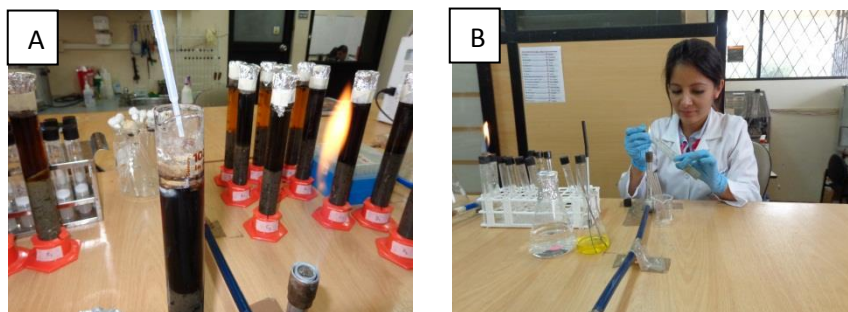
Para el aislamiento de *Aeromonas* se elaboró la columna de Winogradsky con muestras de suelo del lugar donde se colocaron las trampas de microorganismos, se adicionó  $\text{CaSO}_4$ ,  $\text{Ca}_2\text{CO}_3$  y tiras de papel finamente cortado para ser introducidas en probetas de 100 mL junto con la solución madre diluida en una relación 50:50 (figura 2.3). Las columnas se dejaron en incubación durante 30 días con un fotoperiodo de 16

horas de luz y 8 de oscuridad. Finalizado este tiempo, se procedió a tomar muestras de algunas zonas y se inocularon en un medio enriquecido semisólido (Pacheco V., García , & Núñez M, 2011) para permitir que las colonias crecieran suspendidas en el lapso de dos semanas (figura 2.4).



**Figura 2.3:** Columnas de Winogradsky elaboradas para el aislamiento de *Aeromonas*.

Estas colonias fueron extraídas del medio con ayuda de pipetas pasteur para ser sembradas en agar nutriente (AN) modificado por según Van Niel's (anexo D) y se incubaron a 35 °C por 48 h de manera aerobia y anaerobia en jarras de Gaspack en completa oscuridad.



**Figura 2.4:** Toma de muestras de: A) las columnas de Winogradsky y B) del medio enriquecido.

Para la identificación, se realizó la tinción Gram para diferenciar su morfología celular en el microscopio y se aplicó la prueba catalasa y oxidasa. También el API 20 NE (anexo M) fue usado para determinar el tipo de bacteria presente.

### 2.5.3. Masificación y conteo de microorganismos

A partir del crecimiento de los microorganismos de interés en los medios sólidos, se seleccionaron los mejores crecimientos para transferirlos a los respectivos medios líquidos.

Para la masificación de *Saccharomyces* se hizo un raspado de las colonias en PDA y se transfirió a un frasco con 50 mL de caldo papa dextrosa (anexo E). Se le agregó núcleos de ebullición para facilitar la mezcla y se transfirió a frascos 500 mL conteniendo 450 mL del medio antes descrito, posteriormente se colocó una bomba de aireación con capacidad de 2 L/min para permitir el crecimiento de las levaduras y se dejó incubar a temperatura ambiente (figura 2.5).



**Figura 2.5:** Masificación de *Saccharomyces*, *Lactobacillus* y *Aeromonas*.



El conteo se llevó a cabo cada dos días en la cámara de Neubauer aplicando la fórmula propuesta por GAB (2006):

$$\frac{X \text{ levaduras}}{Y \text{ cuadros}} \times \frac{\# \text{ cuadros cámara}}{\text{Volumen cámara}} \times \frac{1000 \text{ mm}^3}{1 \text{ cm}^3 (\text{ó } 1 \text{ mL})} = x \text{ millones de levaduras/mL}$$

Habiendo alcanzado aproximadamente  $4.5 \times 10^8$  levaduras/mL, se procedió a transferirlas a un frasco de 1000 mL conteniendo 400 mL de caldo papa dextrosa.

Para la masificación de *Lactobacillus* y *Aeromonas* se realizó el mismo protocolo de *Saccharomyces*, a excepción de que los frascos no se mantuvieron en aireación (figura 2.5). Las colonias se transfirieron del medio sólido al líquido (anexos F y G respectivamente) y para el conteo se realizaron diluciones hasta  $10^{-3}$ , agregando una gota de cristal violeta para facilitar el procedimiento en la cámara de Neubauer. El conteo se realizó de acuerdo a lo planteado por Celeromics (2013):

$$\text{Concentración} = \frac{\text{Número de células} \times 10000}{\text{Número de cuadros} \times \text{Dilución}} = x \text{ millones de células/mL}$$

#### **2.5.4. Elaboración de biol con microorganismos nativos**

El biol tuvo una composición base en todos los tratamientos, la cual consistió en estiércol bovino, melaza, suero de leche, espinaca y agua (tabla 2.3). Estos componentes

se colocaron en los biodigestores y finalmente se adicionó de manera independiente, los microorganismos nativos obtenidos con anterioridad.

**Tabla 2.3:** Proporción de cada uno de los ingredientes por biodigestor de 30 L de cada una de las formulaciones de biol en estudio.

Componentes	Unidad	Cantidad
Melaza	Kg	0.3
Microorganismo nativo	L	0.3
Suero de leche	L	0.6
Espinaca	Kg	0.6
Estiércol bovino	Kg	6.0

Fuente: Robalino, 2011.

Los biodigestores consistieron en tanques herméticos con capacidad de 60 L provistos de una válvula para evacuación de gases en trampa de agua (figura 2.6), otra válvula para recolección de muestras y una para inyección de CO<sub>2</sub>. Se dejaron en digestión durante 25 días para asegurar la fermentación. No se hizo reactivación para evitar contaminaciones y durante el proceso se realizaron muestreos semanales para controlar el pH, la sobrevivencia de los microorganismos inoculados en un inicio y descartar posibles patógenos en el proceso.



**Figura 2.6:** Digestores para la elaboración de biol.

### **2.5.5. Análisis del biol**

Una vez que cesó la producción de gas evidenciado en la ausencia de burbujeo en la trampa de agua, se dio por finalizado el periodo de fermentación y se procedió a realizar los respectivos análisis al biol. El análisis químico fue llevado a cabo por el laboratorio de suelos de Agrocalidad.

Para el análisis microbiológico se ejecutaron siembras directas de biol producido en los medios de cultivo específicos descritos en el apartado 2.5.2 y en TSA para permitir el crecimiento de todo tipo de microorganismos. Igualmente se realizó siembras en agar *Salmonella–Shigella* para descartar la existencia de posibles patógenos en el biol elaborado. Con los microorganismos obtenidos se ejecutaron pruebas de identificación con tinción Gram y API 20 AUX para levaduras, API CHL 5 para *Lactobacillus* y API 20 E para bacterias Gram negativas.

### **2.5.6. Aplicación de biol**

Una vez seleccionado el biol con mayor volumen, se continuó con su aplicación sobre cultivos de soya para forraje (*Glycine max*), se trabajó con tres dosis de aplicación comparadas con un testigo (agua destilada) y con un fertilizante químico. La dosificación de biol y del fertilizante químico se realizó quincenalmente en un periodo de 30 días, en donde se trabajó con disoluciones de 25, 50 y 75% de biol por bomba de 20 L (tabla 2.4).

**Tabla 2.4:** Dosificación del biol para un volumen total de 20 L.

Dilución	Volumen de biol (mL)	Volumen de agua (mL)
25%	5	15
50%	10	10
75%	15	5

## 2.5.7. Evaluación del crecimiento de la soya

### 2.5.7.1. Medición de la altura de plantas de soya

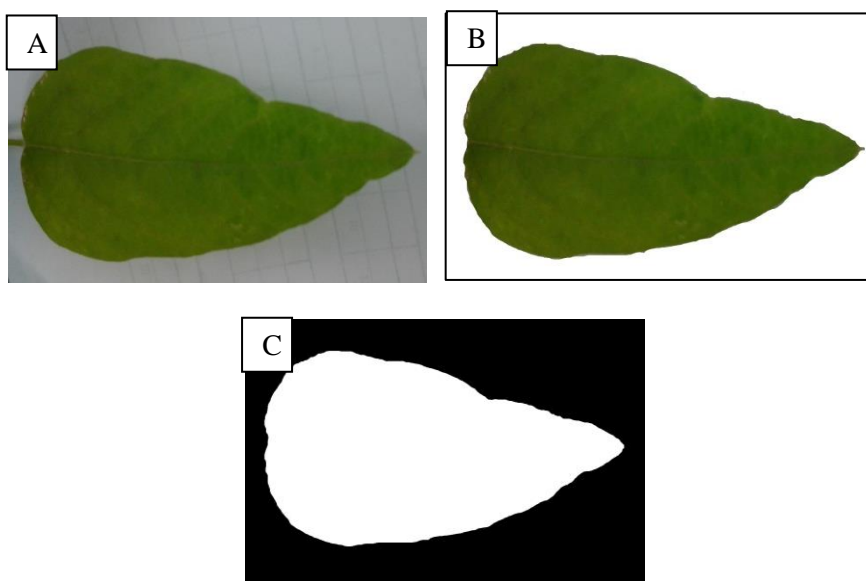
Previo a la siembra, las semillas de soya se dejaron reposar en agua durante la noche y posteriormente se dejaron un día sobre una toalla húmeda protegidas de la luz para facilitar su germinación. Una vez iniciado el proceso de germinación de las semillas de soya, se procedió a colocarlas en la tierra a una profundidad de 2 cm. La medición de la altura se realizó diariamente con una regla desde la base del suelo hasta la última hoja de la soya (figura 2.7).



**Figura 2.7:** Medición de la altura de las plantas de soya.

### 2.5.7.2. Medición del área foliar

Para la obtención del área foliar se trabajó con fotografías digitales de las hojas de soya de cada tratamiento (figura 2.8), las cuales se editaron en Adobe Photoshop con el objetivo de facilitar su procesamiento. Finalmente, para la estimación del área en píxeles se utilizó un algoritmo, basado en técnicas de procesamiento de imagen, implementado en Matlab por el Ing. Wilbert Aguilar MSc. Con las áreas foliares obtenidas, se realizó el análisis estadístico en el programa InfoStat.



**Figura 2.8:** Hojas de soya: A) fotografía digital, B) imagen editada en Adobe Photoshop y C) imagen procesada en Matlab.

### 2.5.7.3. Medición de longitud de la raíz principal

Al concluir los días de siembra de las plantas de soya, se extrajo la planta entera del suelo y se retiró el exceso de tierra para medir la longitud de la raíz primaria (figura 2.9)



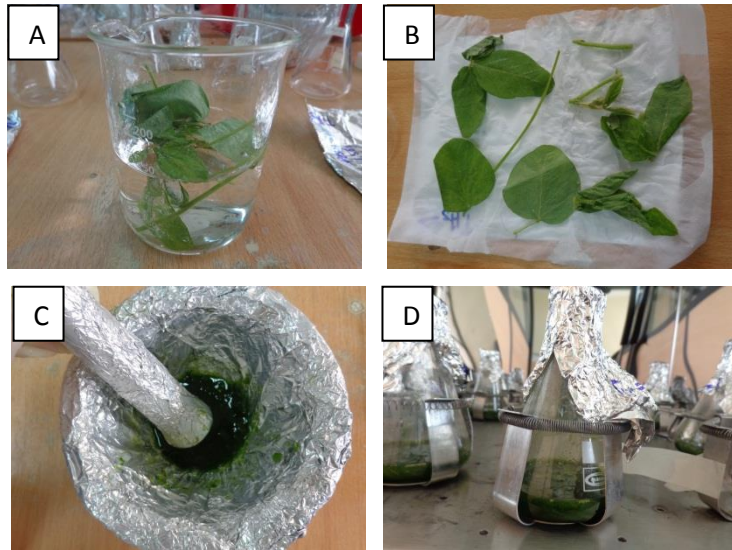
**Figura 2.9:** Medición de la longitud de la raíz principal de las plantas de soya.

### **2.5.8. Evaluación del valor nutricional**

Una vez que las plantas de soya hubieron alcanzado la altura mínima de 40 cm (Martín y Cechetti, 2010) se procedió a evaluar su contenido nutricional mediante la cuantificación de proteínas por el método de Lowry, al ser preciso en la determinación de concentraciones proteicas.

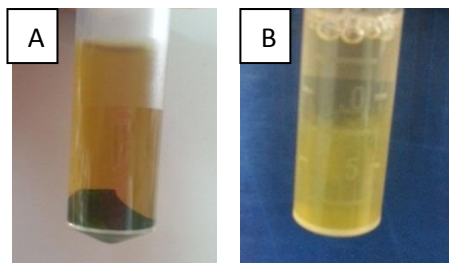
#### **2.5.8.1. Extracción de proteínas vegetales**

Para la extracción de las proteínas, se pesó 1 g de cada planta de soya (hojas y tallos), se cortaron finamente y se trituraron en un mortero con 10 mL de agua destilada. Seguidamente se transfirió todo el preparado a un erlenmeyer y se agregó 1 mL de NaOH 0.2 N, la mezcla se dejó en agitación a 100 rpm por 30 min. De esta mezcla, con ayuda de un cernidero, se eliminó la parte sólida y se recogió exclusivamente la líquida como se observa en la figura 2.10 (Molina, 2005).



**Figura 2.10:** Extracción de proteínas de las plantas de soya: A) lavado, B) secado, C) Macerado y D) agitación con NaOH 0.2 N.

Posteriormente se colectó 1.5 mL del líquido y se almacenó en tubos eppendorf para ser llevado a la centrífuga LABNET a 10000 rpm por 10 min. El sobrenadante fue recogido y se adicionó HCl al 1% hasta tener un pH de 4 y lograr la precipitación de proteínas. Las proteínas precipitadas se presentaron como un conglomerado acuoso en el fondo del tubo eppendorf como se puede observar en la figura 2.11 (Molina, 2005).



**Figura 2.11:** Proceso de extracción de proteínas: A) Extracto proteico centrifugado y B) precipitación de proteínas de soya.

### 2.5.8.2. Cuantificación proteínas vegetales

Previamente, se realizó las soluciones estándar a partir de diversas concentraciones de albúmina de suero bovino (ASB) como se muestra en la tabla 2.5. Posteriormente, a los extractos proteicos obtenidos de la soya y soluciones estándar se adicionó 1000  $\mu\text{L}$  del reactivo de Lowry preparado al instante (anexo H), se agitó y se dejó en reposo por 10 min. Concluido ese tiempo, se procedió a adicionar 100  $\mu\text{L}$  del reactivo de Folin Ciocalteu diluido 1:2 en agua destilada, se agitó la solución y se mantuvo en reposo por 30 min en completa oscuridad (Lowry *et al.*, 1951).

**Tabla 2.5:** Soluciones estándar y muestra problema de proteínas

	<b>Blanco</b>	<b>P1</b>	<b>P2</b>	<b>P3</b>	<b>P4</b>	<b>P5</b>	<b>P6</b>	<b>Pr</b>
Agua ( $\mu\text{l}$ )	200	175	150	100	50	25	0	100
Solución madre ( $\mu\text{l}$ )	0	25	50	100	150	175	200	-
Muestra problema	-	-	-	-	-	-	-	100

Fuente: Lowry, Rosebrough, Lewis, & Randall, 1951.

Finalmente, se leyó la absorbancia a 500 nm en el espectrofotómetro GENESIS 10 UV-VIS Thermo Scientific tanto de los extractos proteicos de la soya como de las soluciones estándar (figura 2.12). Para determinar el contenido de proteína en las muestras problema, se realizó una curva de calibración a partir de las absorbancias de las soluciones estándar de ASB en función de la concentración inicial de proteína (FAO, 2013).





**Figura 2.12:** Cuantificación de proteínas: A) coloración de proteínas con el reactivo de Lowry-Folin y B) lectura de absorbancia a 500 nm.

## 2.6. Análisis de Datos

### 2.6.1. Análisis del volumen de biol

Para la evaluación del volumen de biol con distintos inóculos de microorganismos, se empleó el programa estadístico InfoStat con el fin de seleccionar el biol con un mayor volumen de producción, a partir del análisis de varianza de un factor, prueba de Duncan y normalidad (Gutiérrez & De La Vara, 2008).

### 2.6.2. Análisis químico y microbiológico del biol

El análisis químico del biol producido consistió en comparar los micronutrientes y macronutrientes con un producto químico comercial de composición conocida y basar en ella sus diferencias en cuanto a su composición.

El análisis microbiológico fue realizado mediante siembras en medios específicos para llevar a cabo la caracterización del biol, los microorganismos encontrados se

diferenciaron en base al aspecto y color de su colonia, morfología con tinción Gram, capacidad de asimilar diversos sustratos y se evaluó la sobrevivencia del inóculo inicial mediante la observación del crecimiento o ausencia del microorganismo en medios selectivos. Finalmente, para la comprobación del microorganismo se empleó la tinción Gram y pruebas API.

### **2.6.3. Análisis del crecimiento de la soya**

Para el análisis de los datos recolectados de la altura, área foliar y longitud de la raíz principal de las plantas de soya se usó el programa estadístico InfoStat con el que se realizó el análisis de varianza de un factor, prueba de Duncan y normalidad (Gutiérrez & De La Vara, 2008).

### **2.6.4. Análisis nutricional de la soya**

A partir del porcentaje de proteína, se realizó un análisis de varianza de un factor, prueba de Duncan y normalidad en el programa InfoStat (Gutiérrez & De La Vara, 2008).

## CAPÍTULO 3: RESULTADOS

### 3.1. Inóculos de microorganismos

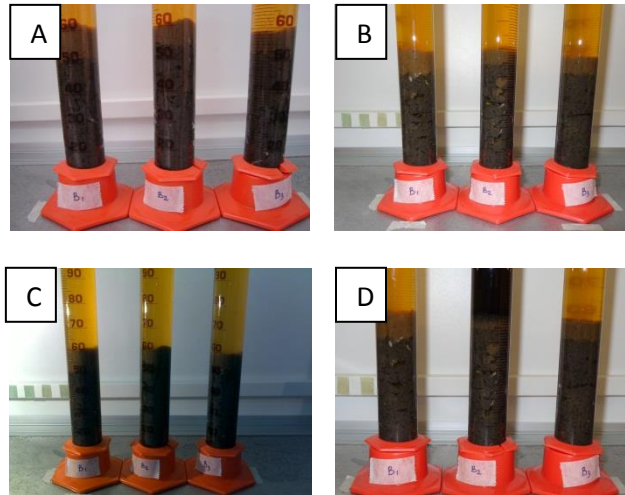
En la figura 3.1 se puede observar las trampas de microorganismos después de tres semanas de fermentación, que permitieron el aislamiento de los microorganismos en estudio, como fueron: *Lactobacillus*, *Saccharomyces* y *Aeromonas*.



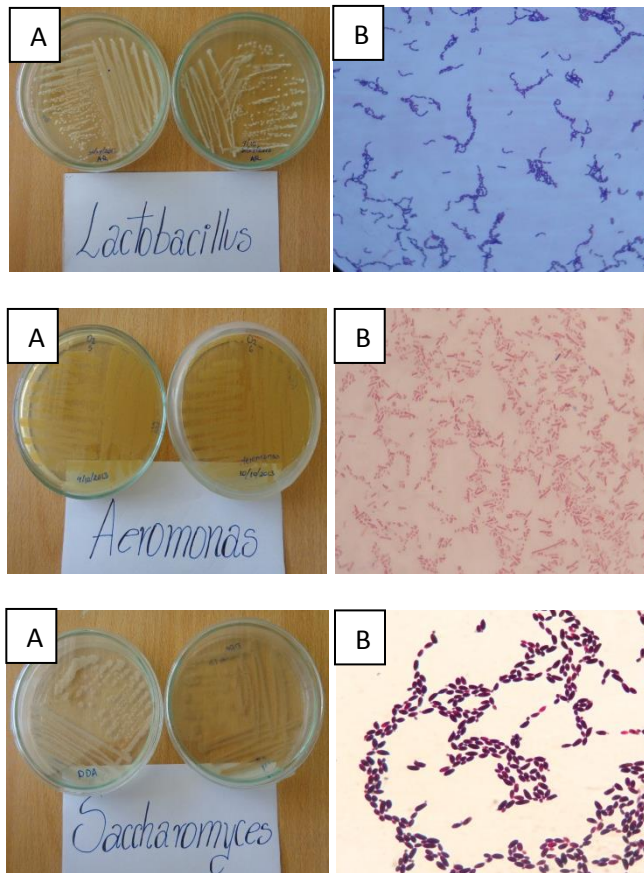
**Figura 3.1:** Fermento de las trampas de microorganismos.

Las columnas de Winogradsky permitieron obtener las bacterias *Aeromonas* al concluir un mes de incubación cuando se comprobó un cambio de color en la muestra de tierra contenida en las columnas (figura 3.2).

Los microorganismos en estudio se seleccionaron por su mejor crecimiento en medios de cultivo y buenas propiedades de fermentación. Los inóculos obtenidos se pueden ver en la figura 3.3, donde se observa uniformidad de las colonias en cuanto a textura y color así como morfología celular y tipo de tinción Gram.



**Figura 3.2:** Incubación de las columnas de Winogradsky a: A) primera semana, B) segunda semana, C) tercera semana y D) cuarta semana.



**Figura 3.3:** Inóculo de microorganismos: A) vista macroscópica del crecimiento en agar B) vista microscópica a 100X.

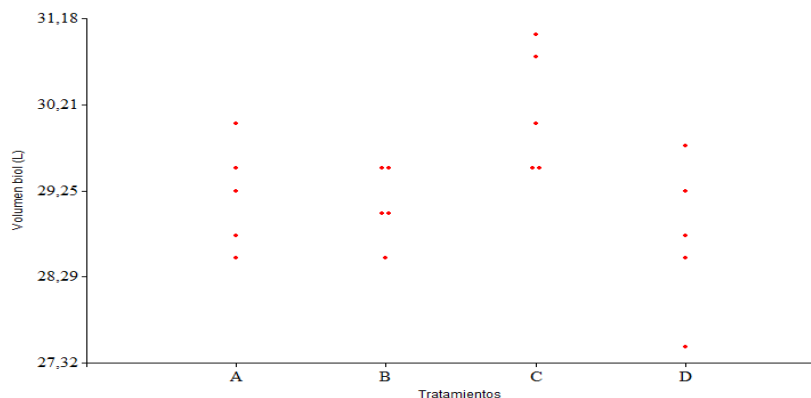
### 3.2. Análisis del volumen de biol

El análisis estadístico realizado en el programa InfoStat demuestra que existe una diferencia estadística significativa para la variable volumen del biol producido, resultado del efecto de la composición respecto al microorganismo inoculado (anexo J). Las medias de los tratamientos resultaron diferentes (valor  $-p = 0.0241$ ), como se observa en la siguiente tabla:

**Tabla 3.1:** Análisis de la varianza para la variable volumen en InfoStat.

Fuente de variabilidad	Suma de cuadrados	G.L	Cuadrado de la media	F-Valor	p-Valor
Modelo	5.38	3	1.79	4.12	0.0241
Tratamiento	5.38	3	1.79	4.12	0.0241
Error	6.95	16	0.43		
Total	12.33	19			

Así mismo en la figura 3.4 se puede apreciar la distribución de los valores del volumen con respecto a la composición del biol.



**Figura 3.4:** Variabilidad del volumen de biol producido en los diferentes tratamientos en InfoStat.

Dado que existió una diferencia significativa entre los tratamientos, se llevó a cabo la prueba de Duncan para comparar las medias entre tratamientos. Se encontró que el tratamiento de biol elaborado con *Lactobacillus* (tratamiento C) fue el que produjo un mayor volumen, por tanto se sitúa en el mayor rango de significancia como se muestra en la tabla 3.2. Para los tratamientos de biol elaborado con *Saccharomyces* (tratamiento B), *Aeromonas* (tratamiento A) y mezcla de microorganismos (tratamiento D) no hubo una diferencia significativa y por tanto no se consideraron para la aplicación del mismo en campo. Los supuestos estadísticos empleados se pueden observar en el anexo I.

**Tabla 3.2:** Prueba Duncan para la variable volumen de biol en InfoStat.

<b>Tratamiento</b>	<b>Medias</b>	<b>n</b>	<b>E.E</b>	<b>Resultado</b>
C	30.15	5	0.29	B
A	29.20	5	0.29	A
B	29.10	5	0.29	A
D	28.75	5	0.29	A

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0.05$ ).

### 3.3. Análisis de la composición del biol

El análisis químico y microbiológico fue llevado a cabo transcurrido los 25 días de fermentación del biol, para ello se tomó muestras representativas de la repeticiones del biol con *Lactobacillus*.

### 3.3.1. Análisis químico del biol

El análisis químico del biol fue llevado a cabo por Agrocalidad en el Laboratorio de Fertilizantes, los resultados se detallan en el anexo O. En cuanto a la composición química, difiere del fertilizante químico, en que el contenido de fósforo y calcio fue menor para el biol comparado con valores del 20% y 6% para cada elemento respectivamente del tratamiento químico.

### 3.3.2. Análisis microbiológico del biol

Las siembras realizadas en agar *Salmonella – Shigella* descartaron la presencia de *Salmonella*, *Shigella*, *Escherichia coli* y *Proteus* como posibles patógenos en el biol elaborado (figura 3.5).

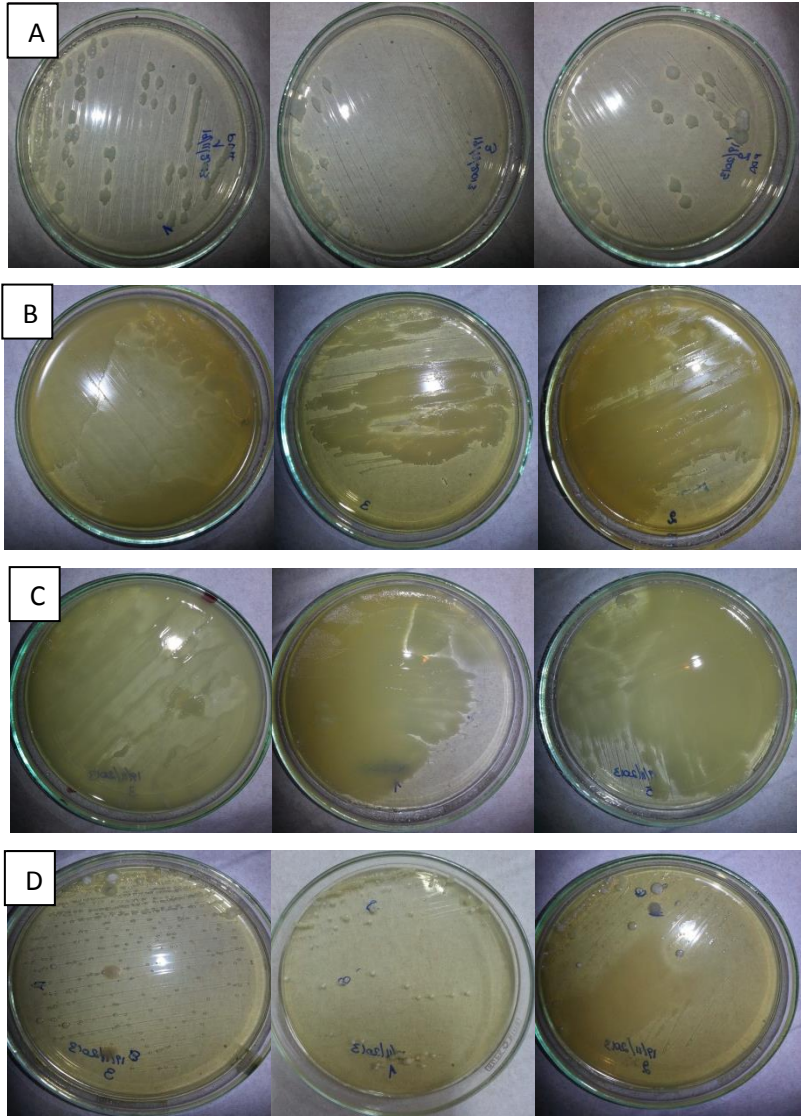


**Figura 3.5:** Siembra de biol en medio *Salmonella-Shigella*.

#### 3.3.2.1. Morfología de la colonia

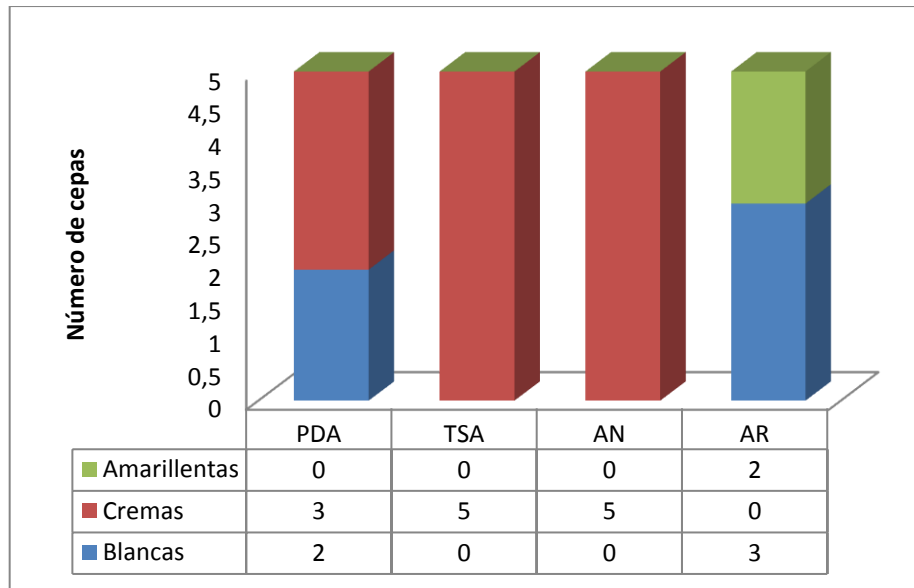
En cada una de las unidades experimentales a nivel de biodigestores elaborados con *Lactobacillus*, se realizaron siembras en medios específicos (figura 3.6) y se obtuvieron

colonias diferentes en base al color (figura 3.7) y consistencia de sus colonias (figura 3.8).

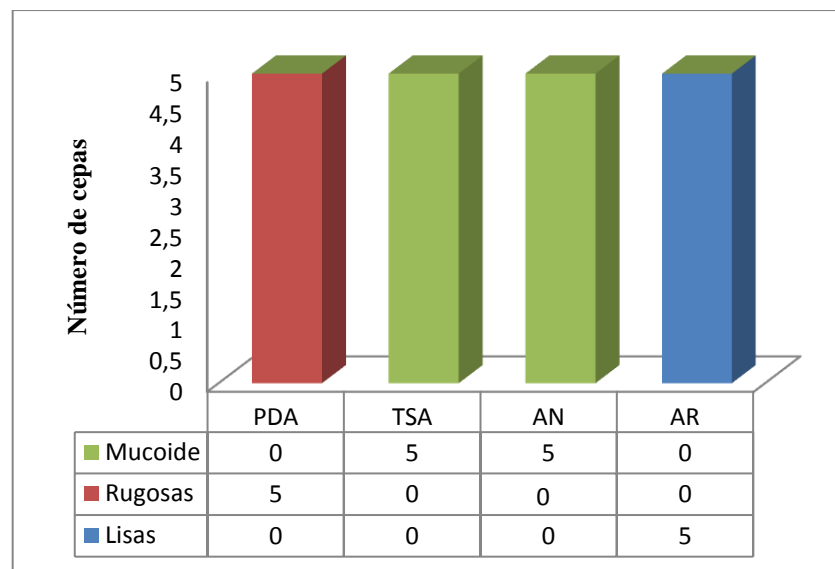


**Figura 3.6:** Siembra de biol en medio: A) PDA, B) TSA, C) AN y D) MRS agar.





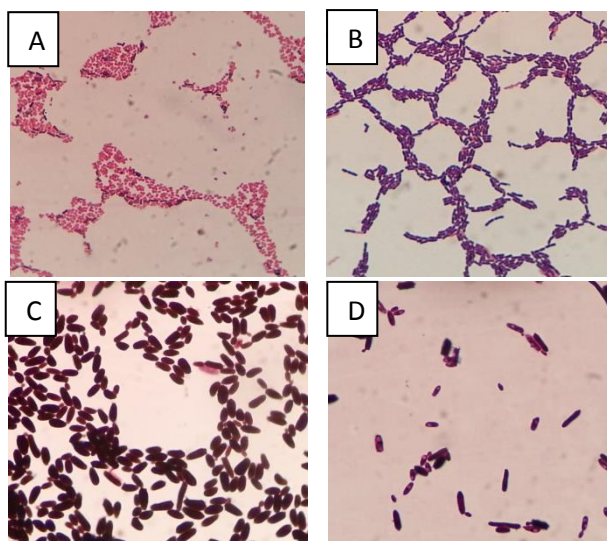
**Figura 3.7:** Número de cepas de acuerdo al color de la colonia en los distintos agares en Excel.



**Figura 3.8:** Número de cepas de acuerdo a la consistencia de las colonia en los distintos agares en Excel.

### 3.3.2.2. Morfología microscópica de los microorganismos

A partir de las colonias en los diferentes medios de cultivo, se obtuvieron microorganismos con morfologías distintas. En MRS agar hubo crecimiento de bacilos Gram positivos y de células cilíndricas Gram positivas, en TSA y AN se dio el crecimiento de bacilos Gram negativos y en PDA estuvieron presentes células cilíndricas Gram positivas (figura 3.9).

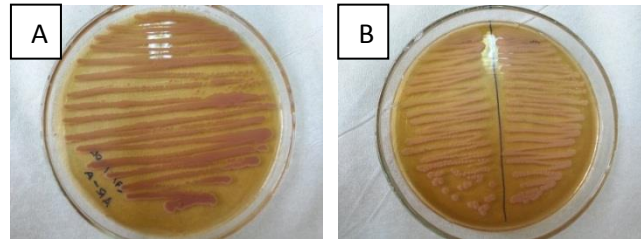


**Figura 3.9:** Vista microscópica a 100X de: A) bacilos Gram negativos, B) bacilos Gram negativos, C) levaduras del AR y D) levaduras del PDA.

### 3.3.2.3. Identificación de microorganismos

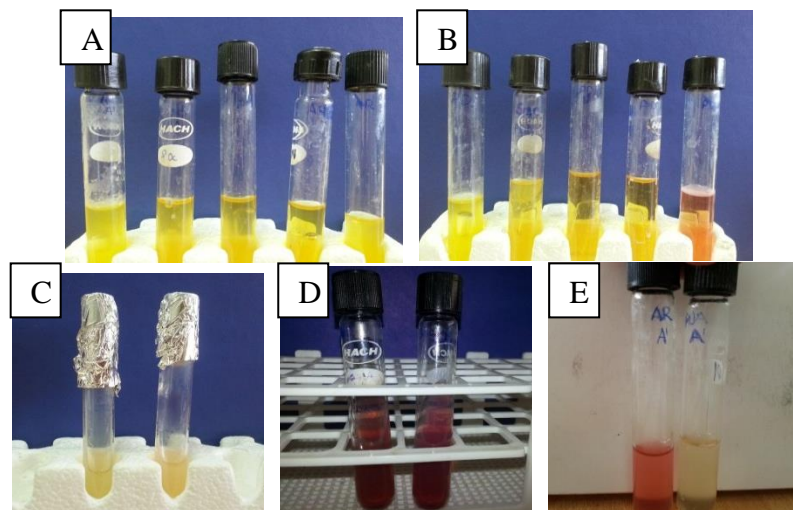
Para el caso de las levaduras que se obtuvo en AR y en PDA, se las sembró en CHROMAgar para diferenciarlas por el color de sus colonias. Un color rosa pálido y de aspecto rugoso de las colonias presente en PDA puso en evidencia la posibilidad de ser

del género *Candida* y un color lila rosáceo de las colonias presentes en MRS agar de otro tipo de levaduras (figura 3.10).



**Figura 3.10:** Siembra en CHROMAgar de colonias de levaduras provenientes de: A) MRS agar y B) PDA.

Para las pruebas convencionales en la identificación de levaduras se siguió el protocolo del anexo K. En la figura 3.11 se puede ver los resultados de las pruebas de fermentación y asimilación de carbohidratos, asimilación de nitratos, urea y otras pruebas bioquímicas y los resultados de las pruebas de identificación de las levaduras presentes en PDA (C1-PDA) y MRS agar (C2-MRS) se encuentran en el anexo L.



**Figura 3.11:** Pruebas de: A) fermentación de carbohidratos para levaduras en AR, B) fermentación de carbohidratos para levaduras en PDA, C) urea, D) agar McConkey y E) asimilación de nitratos.

Del análisis realizado al biol elaborado con *Lactobacillus* mediante pruebas convencionales e instantáneas API (anexo M), se encontró que en todas las repeticiones la presencia de ciertos microorganismos fue recurrente, como se observa en la tabla 3.3

**Tabla 3.3:** Géneros de microorganismos encontrados en los biodigestores analizados.

Microorganismos encontrados	Biodigestores evaluados	Biodigestores con presencia positiva
<i>Lactobacillus paracasei</i>	5	4
<i>Serratia plymuthica</i>	5	4
<i>Pichia subpelliculosa</i>	5	5
<i>Candida diddensiae</i>	5	5

### 3.4. Análisis del crecimiento de soya

#### 3.4.1. Medición de la altura de plantas de soya

Para la variable crecimiento, la tabla 3.4 indica que existió una diferencia estadística significativa (valor  $-p = 0.0002$ ) en la concentración de biol adicionado. En el anexo N se puede observar el crecimiento de las plantas de soya en el lapso de un mes en los diferentes tratamientos.

**Tabla 3.4:** Análisis de la varianza para la variable altura en InfoStat.

Fuente de variabilidad	Suma de cuadrados	G.L	Cuadrado de la media	F-Valor	p-Valor
Modelo	19194.97	36	533.19	2.09	0.0015
Tratamiento	5954.07	4	1488.52	5.82	0.0002
Bloque	13240.90	32	413.78	1.62	0.0320
Error	32721.93	128	255.64		
Total	51916.90	164			

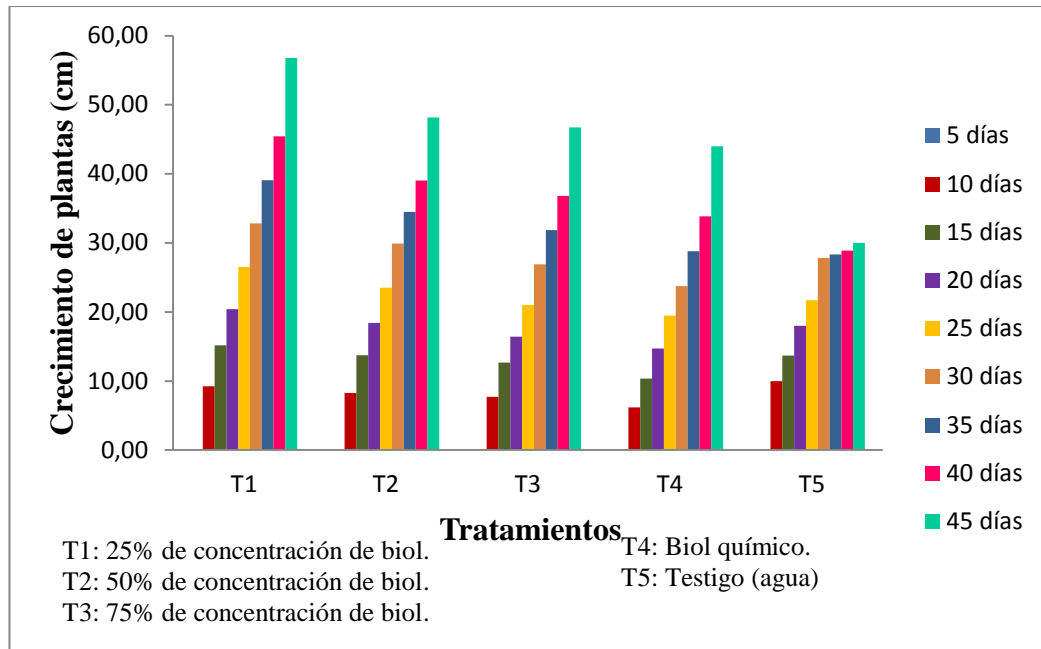
Como existió una diferencia significativa entre tratamientos, se realizó la prueba de Duncan para determinar el mejor tratamiento. Se logró una mayor altura de las plantas con el tratamiento del 25% de concentración (T1), con una media de 56.80 cm, como se indica en la tabla 3.5. En el anexo I se pueden observar los supuestos estadísticos realizados para los valores de la variable altura.

**Tabla 3.5:** Prueba Duncan para la variable altura en InfoStat.

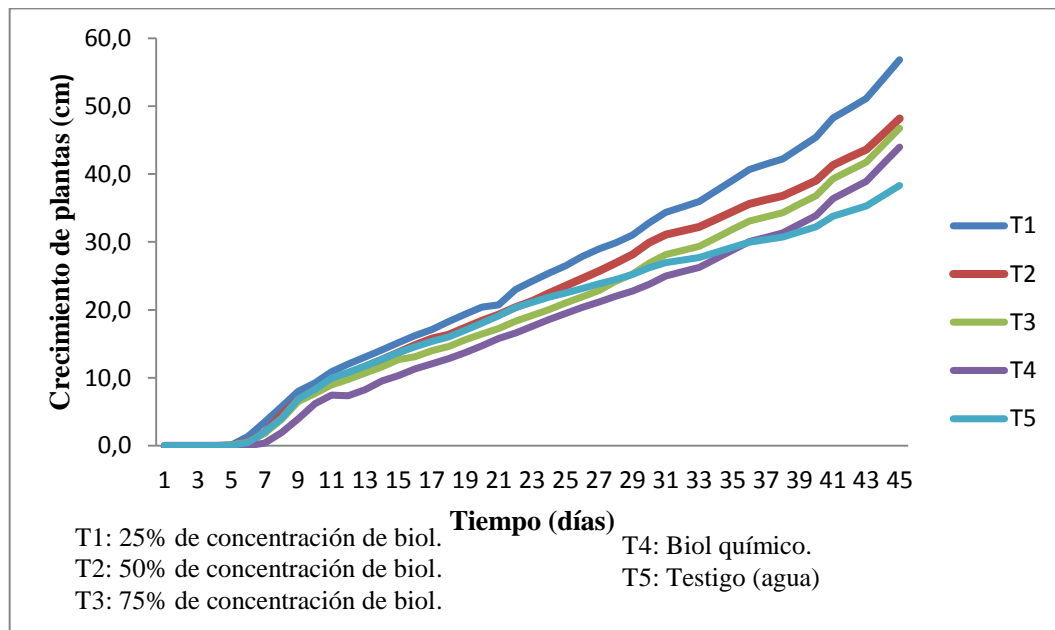
Tratamiento	Medias	n	E.E	Resultado
T1	56.80	33	2.78	A
T2	48.17	33	2.78	B
T3	46.73	33	2.78	B
T4	44.29	33	2.78	B C
T5	38.30	33	2.78	C

En la figura 3.12 se muestra la variabilidad de la altura promedio de las plantas de soya respecto a cada tratamiento fertilizante y un testigo (agua). Se observó que las plantas con el 25% de concentración de biol aplicado (T1), alcanzaron mejores alturas en comparación con el resto de tratamientos.

La figura 3.13 muestra la variación de alturas de plantas de soya en los cinco tratamientos. La evaluación del crecimiento durante los 30 días muestra que las plantas con los tratamientos biológicos alcanzaron mayores alturas en comparación al tratamiento químico que fue el menos eficiente. A partir de los 36 días de siembra, las plantas con el tratamiento químico alcanzaron mayores alturas que el tratamiento testigo (agua), sin embargo, los tratamientos biológicos presentaron mayores alturas de sus plantas durante los 45 días de evaluación.



**Figura 3.12:** Promedio de la altura de plantas de soya con las diferentes dosis de aplicación de biol con *Lactobacillus* en Excel.



**Figura 3.13:** Dinámica del crecimiento de plantas de soya durante 45 días de crecimiento en Excel.

### 3.4.2. Medición área foliar

Como se puede observar en la tabla 3.6, existió una diferencia estadística significativa (valor  $-p = 0.0001$ ) para la variable área foliar de las plantas de soya frente al efecto de las diferentes concentraciones de biol.

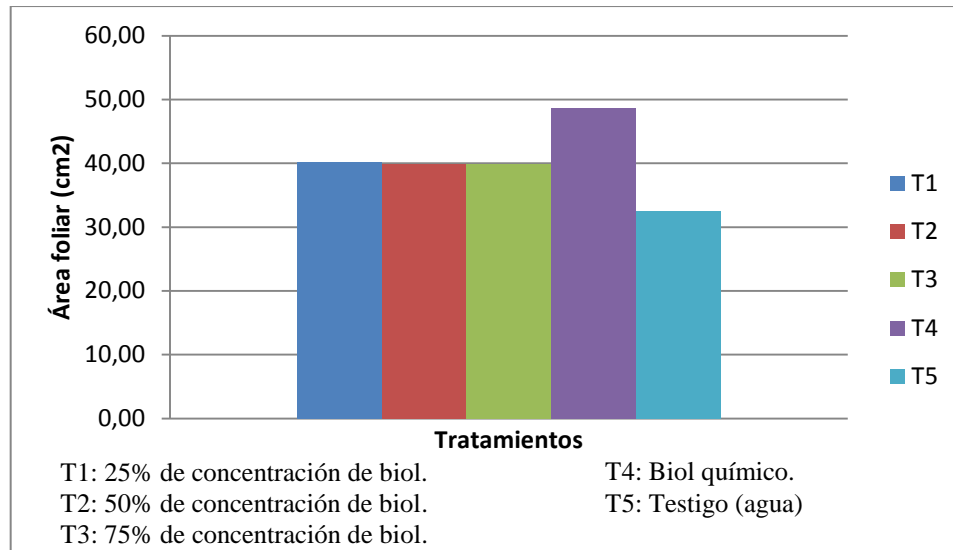
**Tabla 3.6:** Análisis de la varianza para la variable área foliar en InfoStat.

Fuente de variabilidad	Suma de cuadrados	G.L	Cuadrado de la media	F-Valor	p-Valor
Modelo	2872.50	18	159.58	2.27	0.0100
Tratamiento	1946.76	4	486.69	6.93	0.0001
Bloque	925.74	14	66.12	0.94	0.5216
Error	3930.87	56	70.19		
Total	6803.37	74			

Al existir diferencias significativas entre los tratamientos, la prueba de Duncan permitió conocer que el mejor tratamiento fue el químico (T4) con una media del área foliar de  $48.61 \text{ cm}^2$  (tabla 3.7), superando de esta manera a los tratamientos del biol (T1, T2 y T3), sin embargo los tratamientos biológicos alcanzaron valores altos para el área foliar en comparación al control (T5). La variabilidad del área foliar respecto a cada tratamiento fertilizante y un testigo (agua) se muestra en la figura 3.14. En el anexo I se pueden observar los supuestos estadísticos realizados para los valores del área foliar.

**Tabla 3.7:** Prueba Duncan para la variable área foliar en InfoStat.

Tratamiento	Medias	n	E.E	Resultado
T4	48.61	15	2.16	A
T1	40.28	15	2.16	B
T3	39.93	15	2.16	B
T2	39.92	15	2.16	B
T5	32.52	15	2.16	C



**Figura 3.14:** Variabilidad del área foliar de las plantas de soya con diferentes dosis de aplicación de biol con *Lactobacillus* en Excel.

### 3.4.3. Medición de la longitud de la raíz principal

Para la variable longitud de la raíz primaria de las plantas de soya, la tabla 3.8 muestra que no existió una diferencia estadística significativa (valor  $-p = 0.4248$ ) en la concentración de biol adicionado.

**Tabla 3.8:** Análisis de la varianza para la variable longitud de la raíz primaria en InfoStat.

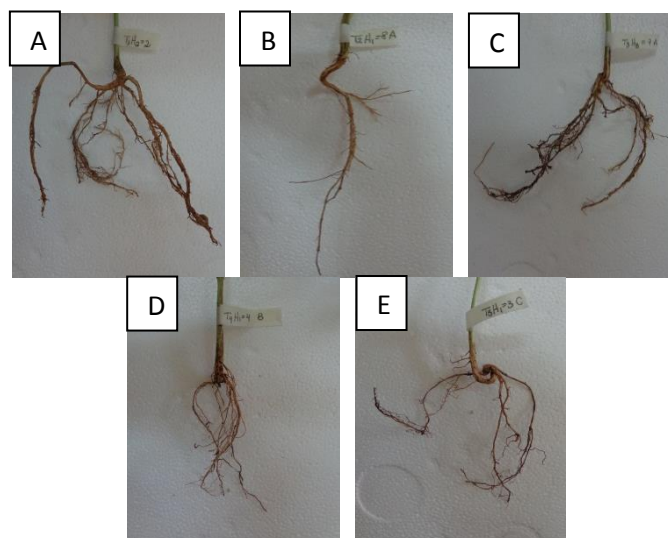
Fuente de variabilidad	Suma de cuadrados	G.L	Cuadrado de la media	F-Valor	p-Valor
Modelo	89.72	13	6.90	0.70	0.7500
Tratamiento	39.06	4	9.76	0.99	0.4248
Bloque	50.67	9	5.63	0.57	0.8112
Error	354.66	36	9.85		
Total	444.39	49			



Por tanto al no existir una diferencia significativa entre tratamientos, la prueba de Duncan dio a conocer que todos los tratamientos tenían el mismo efecto sobre la longitud de la raíz (figura 3.15). De acuerdo a las medias del crecimiento de raíz, se puede observar en la tabla 3.9, que el tratamiento con el 50% de concentración (T2) mostró mayores valores en comparación al control (T5) y del resto de los tratamientos fertilizantes (T1, T3 y T4). Los supuestos estadísticos empleados se pueden observar en el anexo I.

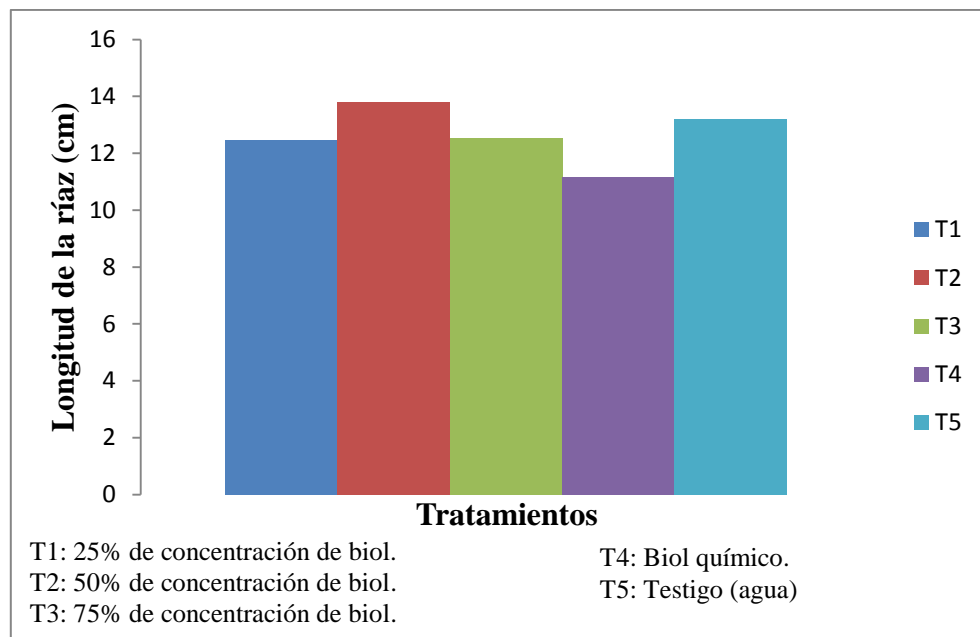
**Tabla 3.9:** Prueba Duncan para la variable longitud de la raíz en InfoStat.

[% biol]	Medias	n	E.E	Resultado
T2	13.81	10	0.99	A
T5	13.19	10	0.99	A
T3	12.53	10	0.99	A
T1	12.46	10	0.99	A
T4	11.16	10	0.99	A



**Figura 3.15:** Longitud de la raíz principal de pantas de soya del tratamiento: A) dosis del 25% de concentración de biol, B) dosis del 50% de concentración de biol, C) dosis del 75% de concentración de biol, D) biol químico y E) testigo.

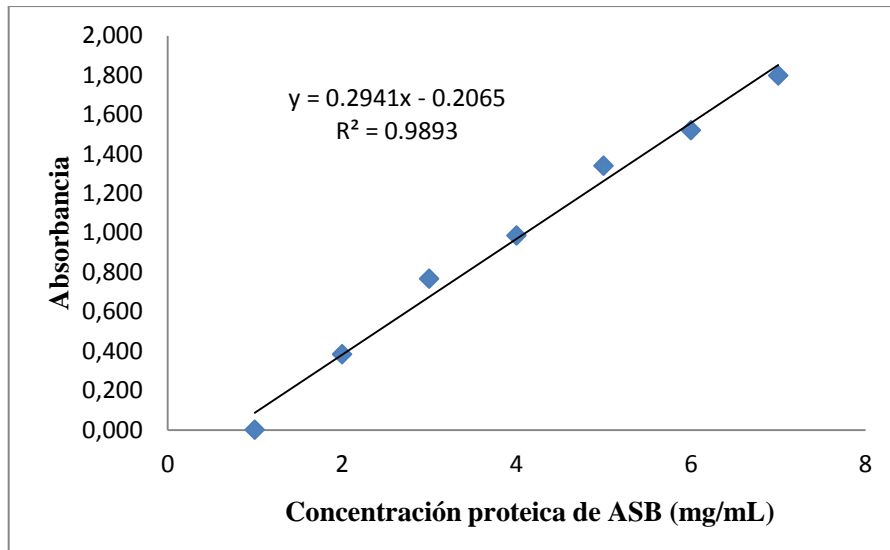
La variabilidad de la longitud de la raíz primaria respecto a cada tratamiento fertilizante y un testigo (agua) se muestra en la figura 3.16. Se puede observar que las plantas con aplicación del 50% de concentración (T2) presentaron raíces con mayor longitud pese a no ser muy significativa la diferencia con el resto de los tratamientos estudiados.



**Figura 3.16:** Variabilidad de la longitud de la raíz de las plantas de soya con diferentes dosis de aplicación de biol con *Lactobacillus* en Excel.

### 3.5. Análisis de variables nutricionales

El valor nutricional representado por el contenido de proteínas en las plantas de soya, fue determinado por medio de la curva de calibración ( $R^2=0.9893$ ) a partir de la lectura de las absorbancias de ASB (figura 3.17).



**Figura 3.17:** Curva de calibración a partir de las soluciones estándar de ASB en Excel.

### 3.5.1. Contenido de proteínas en plantas de soya

A partir de la ecuación de la curva de calibración,  $y=0.2941x - 0.2065$ , se calculó las concentraciones proteicas en las diferentes muestras. Para la variable concentración de proteína, existió una diferencia estadística significativa (valor  $-p = 0.0355$ ) en a la concentración de biol adicionado, como se puede observar en la tabla siguiente:

**Tabla 3.10:** Análisis de la varianza para la variable concentración proteica en InfoStat.

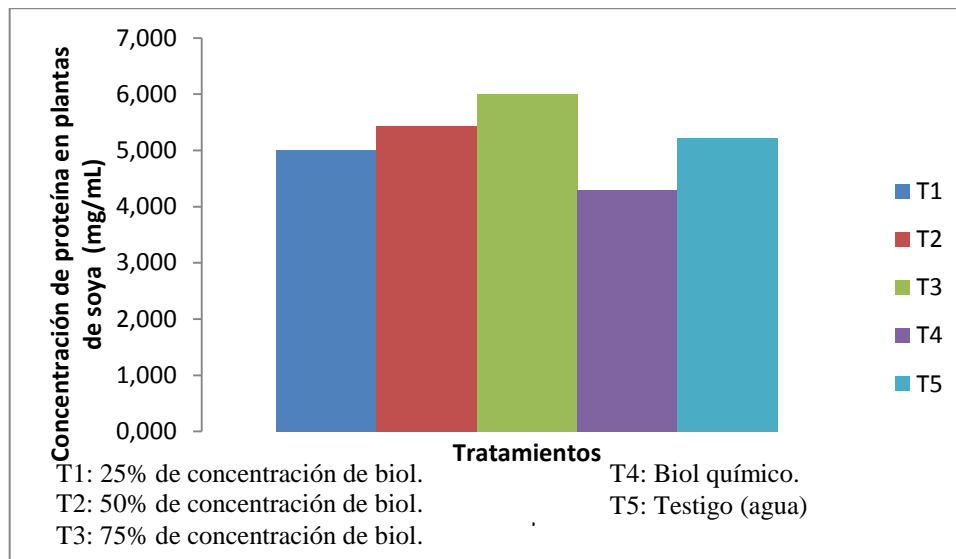
Fuente de variabilidad	Suma de cuadrados	G.L	Cuadrado de la media	F-Valor	p-Valor
Modelo	51.55	13	3.97	2.08	0.0411
Tratamiento	22.04	4	5.51	2.90	0.0355
Bloque	29.51	9	3.28	1.72	0.1194
Error	68.51	36	1.90		
Total	120.05	49			

La prueba de Duncan permitió determinar el mejor tratamiento. Se obtuvo que el tratamiento con el 75% de concentración de biol fue el mejor en cuanto a crecimiento de la planta de soya con una media de 6.35 mg/mL de proteína, como se indica en la tabla 3.11. Los supuestos estadísticos aplicados para variable concentración proteica se pueden observar en el anexo I.

**Tabla 3.11:** Prueba Duncan para la variable concentración proteica en InfoStat.

Tratamiento	Medias	n	E.E	Resultado
T3	6.35	10	0.44	A
T2	5.44	10	0.44	A B
T5	5.22	10	0.44	A B
T1	5.01	10	0.44	A B
T5	4.30	10	0.44	B

En la figura 3.18 se puede observar que el tratamiento con 75% de concentración del biol, mostró mayores concentraciones proteicas.



**Figura 3.18:** Variabilidad de la concentración de proteína en las plantas de soya con diferentes dosis de aplicación de biol con *Lactobacillus* en Excel.

## CAPÍTULO 4: DISCUSIÓN

### 4.1. Inóculo de microorganismos

Las trampas colocadas en el suelo permitieron la obtención de un consorcio de microorganismos benéficos, los cuales al existir en suelos fértiles se han podido emplear como apoyo en la producción agropecuaria. Su efecto se intensifica por la acción del consorcio en el que se encuentran. Son básicamente cuatro los grupos que existen en una mayor cantidad: levaduras, actinomicetos, bacterias ácido lácticas y bacterias fotosintéticas, sin embargo bacterias de otros géneros y especies pueden estar presentes (Picado & Añazco, 2005).

Con el uso de medios de cultivo selectivos se logró el aislamiento y reproducción de *Lactobacillus*, *Saccharomyces* y *Aeromonas* respectivamente. Según Fernández y otros, (2006), la importancia de un medio de cultivo radica en su composición, al reducir posibles interferencias de poblaciones de microorganismos no deseadas, por tanto se diferenciarán en aquellos que permitirán el crecimiento de un determinado grupo de microorganismos (selectivos) o los que permitan el crecimiento de muchos grupos de microorganismos (no selectivos).

El medio de cultivo MRS desarrollado por Man, Rogosa y Sharpe permitió el crecimiento de *Lactobacillus* al inhibir el crecimiento de otras bacterias por estar compuesto por acetato de sodio y tener un pH bajo. Consecuentemente el crecimiento de

estas bacterias ácido lácticas se posibilita por la presencia de factores de crecimiento específicos como tween 80 que es un agente tensoactivo, facilitando la absorción de nutrientes, fosfato de potasio que actúa como un agente tampón, magnesio y manganeso que son cationes para el metabolismo celular y dextrosa como el hidrato de carbono fermentable (Corry *et al.*, 1999; Neogen, 2011; Sigma-Aldrich, 2014).

El PDA es un medio que sirve para aislar y reproducir una diversidad de hongos y levaduras porque contiene infusión de papa que sirve como una fuente de almidón y dextrosa que es la fuente de carbono. El pH juega un papel importante para el crecimiento de estos hongos y levaduras, lo ideal es un pH bajo, pues a pH neutro o alcalino prevalece el crecimiento de bacterias (Fernández *et al.* 2006; Dibico, 2010). Con la adición de un antibiótico como el cloranfenicol se logró también la inhibición del crecimiento bacteriano.

El uso de columnas de Winogradsky permitió obtener muestras de microorganismos para su siembra en medios selectivos. En estas columnas coexiste una diversidad de microorganismos que se agrupan de acuerdo a sus necesidades metabólicas (Anderson & Hairston, 1999). Por tanto bacterias del género *Aeromonas* fueron aisladas a partir de la siembra en medio mineral y AN semisólido modificado por Van Niel's, que estuvo reforzado con fosfato de potasio que actuó como agente tampón, sulfato de magnesio como aceptor de electrones por medio de la reducción del sulfato y factores de crecimiento como el extracto de levadura que sirven como fuente de carbono (Van Niel's, 1944).

#### 4.2. Análisis del volumen de biol

Al cabo de 25 días de elaboración de biol, cesó la fermentación de los microorganismos en los biodigestores al no existir producción de gases. Según Murillo (2011), el biol está listo cuando el producto elaborado se torna de un color oscuro y la temperatura baja, lo que se traduce en una poca producción de gases.

El análisis del volumen de biol dio como resultado diferencias estadísticas (valor  $-p = 0.0241$ ) en todos los tratamientos (tabla 3.2). Siendo el biol elaborado con *Lactobacillus* el de mejor producción en términos de volumen, estas bacterias son predominantes cuando las condiciones del medio donde se desarrollan son las óptimas, indicando así que los sustratos suministrados aportan tanto cofactores como carbohidratos necesarios. *Lactobacillus* están en la capacidad de producir nisina, antibiótico sintetizado por algunas bacterias ácido lácticas para mantener relaciones antagónicas con todo tipo de bacterias putrefactoras como *Erwinia* spp. y también para controlar *Fusarium* spp. y *Rhizoctonia* spp. (Obregón *et al.*, 2000; Quirós *et al.*, 2004).

El biol elaborado con la mezcla de microorganismos no presentó resultados significativos en los 25 días de producción, por un posible antagonismo, pudiendo ser insuficiente el tiempo que se empleó para que los microorganismos alcanzaran el período de adaptación en el medio líquido y lograr altos valores de proliferación. Pacheco y Uribe (2007), en estudios sobre lactofermentos mediante microorganismos nativos de montañas, muestran que el análisis microbiológico del biofermento líquido

presenta una menor diversidad microbiana por su facilidad de transporte de sustancias inhibitoras en comparación al biofermento sólido que presenta una mayor cantidad de nichos ecológicos, siendo esto un punto positivo para los microorganismos antagónicos que compiten por prevalecer en el medio, como es el caso de *Lactobacillus*, cuya presencia es común. Por otro lado, presentan efectos negativos sobre poblaciones de hongos, levaduras y *Bacillus*, a quienes impide su proliferación.

#### **4.3. Análisis químico y microbiológico del biol**

Luego de transcurrido el tiempo de fermentación (25 días) se efectuaron los análisis químico y microbiológico del biol con un mayor volumen de producción, en este caso del biol con *Lactobacillus*.

Los niveles de pH dentro de los biodigestores durante el proceso de fermentación se mantuvieron algo elevados, siendo los tratamientos B (*Saccharomyces*), C (*Lactobacillus*) y A (*Aeromonas*) los que consiguieron un pH alrededor de 5, a diferencia del tratamiento D (mezcla de microorganismos) que presentó un pH de 4. Molina (2002) explica que el pH tiene una gran influencia en la solubilidad y disponibilidad de los nutrientes, siendo un pH ligeramente ácido (5.5 a 6.5) el óptimo para que puedan ser absorbidos por las plantas.

De acuerdo a estudios sobre biofermentos realizados por Ito (2006), existen evidencias de que al tener un pH bajo, la cantidad de sólidos disueltos en forma de iones



era mayor, lo que se traduce en una mayor solubilidad y cantidad de nutrientes en el fertilizante.

En cuanto al contenido de nutrientes (anexo O), se puede observar que de acuerdo al criterio de aceptación de la NTE INEN 211:98, el contenido de nitrógeno total, fósforo ( $P_2O_5$ ), potasio ( $K_2O$ ) asimilables, está dentro de los valores de tolerancia mínima y máxima al no sobrepasar los 0.49, 0.67 y 0.41 % p/p de los respectivos nutrientes. Para el caso de macronutrientes y micronutrientes se encontró que el contenido de calcio (CaO) y magnesio (MgO) fue bajo, con valores de 0.28 y 0.33 %p/p respectivamente. En cuanto al contenido de cobre, hierro, manganeso, sodio y zinc, sus cantidades fueron las adecuadas, indicando concentraciones superiores a 0.005 % p/p, de acuerdo a la misma normalización.

Ito (2006) en sus estudios, reveló que en el biofertilizante, la concentración de N en forma de nitrato se relaciona con el tiempo, existiendo una menor cantidad de nitratos a un mayor tiempo, los cuales se convertirán en otras formas gaseosas del nitrógeno y junto otros gases producidos durante la fermentación se escaparán, por tanto recomienda su uso en un tiempo no mayor a 30 días para garantizar la presencia de nitratos y también de amoníaco.

Para la elaboración de biol existen muchos protocolos a seguir, en los que se han ido involucrando a los microorganismos para que colaboren en la descomposición de compuestos orgánicos. Con el uso de excretas animales, como gallinaza, estiércol de caballo o bovino, residuos de caña de azúcar, broza de café de vegetales y frutas,

residuos vegetales o animales se han dado buenos productos en la preparación de biol (Murillo, 2011). Por tanto la, elección de los ingredientes también debe basarse en las necesidades del suelo, mismas que se pueden evidenciar a partir de un análisis químico del mismo, de esta manera se podrá suplir las demandas nutricionales de los cultivos.

Realizar una caracterización microbiológica del biol permitió conocer la variabilidad en cuanto a la composición de los microorganismos, observándose que existieron otros tipos de microorganismos diferentes al inoculado en un inicio. Proceso que se asemejaría a una sucesión ecológica, donde a través del tiempo se experimentan cambios en la composición de sus especies, existiendo primero ciertos microorganismos que son reemplazados paulatinamente por otros hasta agotar los nutrientes básicos y culminar con una biomasa estable, diversa y compleja (Abellán, 2006; Rodríguez y Córdova, 2006).

Tales microorganismos encontrados fueron principalmente *Lactobacillus*, cuya presencia fue recurrente en las repeticiones, reportándose en 4 de los 5 biodigestores como se observa en la tabla 3.3. Ito (2006), señala que *Lactobacillus* juega un rol importante en el control del pH, al disminuirlo con la producción de ácidos como el ácido láctico y los ácidos grasos de cadenas cortas.

*Serratia plymuthica* fue otra de las bacterias halladas en el biol producido, de acuerdo a Czajkowski, Der Wolf y Veen (2012), esta bacteria puede ayudarse en suelos ayudando en el control biológico de patógenos en la agricultura mediante la actividad antagonista a partir de la producción de compuestos antibióticos, expresión de enzimas

que catalizan la descomposición de los componentes celulares de patógenos y también por la competencia por espacio y nutrientes.

También se hallaron levaduras como *Candida diddensiae* y *Pichia subpelliculosa*, aplicadas en la industria alimenticia, por ejemplo en la fermentación de aceitunas, con actividades esterilizantes y baja capacidad de sedimentación. Investigaciones en aceitunas han indicado que estos tipos de levadura pueden alcanzar mayores niveles poblacionales entre los 10 a 21 días de fermentación e irá disminuyendo a partir de los 100 días. Por tanto, levaduras del género *Pichia* y *Candida* al intervenir en los procesos de fermentación de aceitunas pueden resistir un pH bajo y altas concentraciones de NaCl (Bautista *et al*, 2011; Botta & Cocolin, 2012).

Lo importante en la elaboración de biol es trabajar con un preparado inocuo que no represente daños a terceros a futuro, por tanto al trabajar con excretas de animales se descartará estiércol proveniente de animales enfermos y se regulará la temperatura para alcanzar aproximadamente unos 70°, con la finalidad de garantizar la eliminación de patógenos en la mezcla. También se deberá evitar exponer el estiércol al sol, lluvia y viento ya que se pierde un 50-60% de su riqueza (Picado y Añazco, 2005; Murillo, 2011). Las elevadas temperaturas a la que se sometió el estiércol antes de hacer el biol, garantizaron la eliminación de bacterias patógenas como *Escherichia coli*, *Salmonella* y *Shigella* principalmente.

#### **4.4. Análisis del crecimiento de soya**

El biol elaborado con *Lactobacillus* se evaluó en tres dosis diferentes de aplicación, 25%, 50% y 75% cada 15 días en cultivos de soya, partiendo desde la germinación de sus semillas. Las diferentes dosis de biol fueron administradas a plantas de soya mediante su presurización con una bomba dosificadora. El biol, al ser aplicado por riego facilita la adsorción de nutrientes y favorece consecuentemente la nutrición de la planta y fertilidad de los suelos, por tanto su uso y cantidades deberán ser suministrados de acuerdo a las necesidades del cultivo y tipo de suelo (Succhini, 2013).

##### **4.4.1. Medición de la altura de plantas de soya**

Durante 45 días se registró la altura de las plantas de soya en los cinco tratamientos. Al analizar la variable altura, se encontró que existieron diferencias estadísticas (valor  $-p = 0.0002$ ) en todos los tratamientos, siendo el tratamiento con 25% de concentración de biol (T1) el que alcanzó el mayor rendimiento para la altura, con 56.80 cm en promedio.

De manera general, se puso en evidencia que todos los tratamientos analizados dieron buenos rendimientos respecto a la altura de las plantas de soya en comparación al control (T5). Según Robalino (2011), un mayor rendimiento del cultivo se puede lograr al tener un pH final ácido del biofermento; al ser más ácido indica una mayor concentración de ácidos orgánicos, los que intervienen en múltiples procesos

fisiológicos de las plantas (fotosíntesis, ciclo de Krebs, etc.) y muchos de ellos actúan en las plantas como hormonas y vitaminas.

Adicionalmente, el análisis químico efectuado al suelo antes, durante y al finalizar el tratamiento con diferentes dosis de biol con *Lactobacillus*, reveló diferencias en cuanto a la composición de macroelementos, microelementos, iones y otros, haciendo evidente diferencias en la respuesta de crecimiento en las plantas de soya (anexo P).

Uno de los parámetros analizados que encierran estas diferencias, es el pH del suelo, el cual se mantuvo en un rango de 6-7, que de acuerdo al rango de valores predeterminados por Agrocalidad, el suelo sería prácticamente neutro, considerándose un pH óptimo para el normal crecimiento de plantas, facilitando la disponibilidad de nutrientes, es decir permite que elementos como el fósforo y demás minerales sean solubles para ser tomados por las raíces de las plantas (Eco Agricultor, 2012).

El nitrógeno también forma parte de los elementos que deben ser absorbidos por las plantas, encontrándose durante todo el periodo de crecimiento de plantas de cada tratamiento, valores aceptables entre 0.16 y 0.3% de su contenido en suelos, de acuerdo a parámetros fijados por Agrocalidad. Sierra (2003), explica que el nitrógeno tiene la capacidad de concentrarse en los primeros 20 cm de suelo siendo parte de la materia orgánica, por tanto al existir una mayor cantidad de esta, entonces habrá una mayor cantidad de nitrógeno total.

La materia orgánica es fundamental para alcanzar una óptima fertilidad del suelo, no solo química sino física y biológica, ayudando a mejorar la estructura del suelo favoreciendo la aireación, filtración y desarrollo radical, así mismo permite el incremento de la biomasa microbiana y la capacidad de intercambio catiónico del suelo (Sierra, 2003). El contenido de materia orgánica fue adecuado para todos los tratamientos analizados, presentando un mayor porcentaje de su concentración a partir de la segunda aplicación de biol.

Adicionalmente, valores altos de fósforo, potasio, calcio y magnesio se encontraron en el suelo correspondiente a cada tratamiento evaluado de acuerdo a los parámetros fijados por Agrocalidad. Por estas características se puede presumir que la textura del suelo es del tipo arcillosa, ya que tiene la capacidad de retener a los elementos porque presenta más carga eléctrica a diferencia de otros tipos de suelo, afectando así su disponibilidad. Por tanto, lo que se requiere es aplicar mayores cantidades del fertilizante para suplir esta necesidad (Sierra, 2003).

Por otro lado, el K se encarga de regular la permeabilidad de la membrana y de la fotosíntesis para proporcionar sustratos esenciales en la fijación del  $N_2$ . El fósforo es el elemento que interviene en los procesos de transporte y transformación de energía. Cuando el suministro de P es bajo e insuficiente podría afectar a la fijación biológica del N (Becker *et al.*, 1991).

De acuerdo a López (1999), los suelos arcillosos son ricos en calcio y magnesio afectan positivamente en la nutrición de las plantas, también al tener una gran superficie

de exposición presentan una mayor capacidad de intercambio catiónico y tendrán mejores respuestas a la fertilización. Se justificará entonces que el tratamiento con la aplicación del 25% de biol (T1) haya obtenido mejores resultados en cuanto al crecimiento de las plantas de soya a diferencia de los otros tratamientos. Las cantidades de calcio y magnesio cada 15 días de aplicación fueron aumentando y pese a que la diferencia no fue mucha con los valores de los otros tratamientos, fue suficiente para lograr mejores rendimientos en cuanto a la altura de las plantas.

En lo que respecta al hierro y zinc, sus cantidades fueron bajas de acuerdo a Agrocalidad (<20 ppm y <3ppm respectivamente) en todos los tratamientos estudiados. También, los otros elementos como el cobre y mangeso, tuvieron concentraciones adecuadas en los suelos estudiados (1.1 - 4 ppm y 6 – 15 ppm correspondientemente), especialmente este último que a partir de los 15 días de aplicación incrementó su cantidad en los suelos de los cuatro tratamientos respecto al control. Las bajas concentraciones de estos elementos origina anormalidades en el crecimiento de plantas, impiendo su normal reproducción (Rave *et al.*, 1992). Por tanto, un suelo con pobres cantidades de nutrientes no tendrían resultados eficaces en el rendimiento de las plantas.

#### **4.4.2. Medición del área foliar.**

El método de estimación del área foliar permitió la obtención de la misma mediante el empleo de relaciones matemáticas, presentándose diferencias estadísticas (valor –  $p = 0.0001$ ) en los tratamientos detallados en la tabla 3.6, revelando una mayor

área foliar en el químico (T4) con una media de 48.61 cm<sup>2</sup> seguido en eficiencia por el tratamiento con el 25% de concentración de biol (T1) con una media de 40.28 cm<sup>2</sup>.

Schwab (1951) manifiesta que a mayores niveles de fósforo, nitrógeno y calcio, el área foliar de las plantas es mayor, lo que contrasta con los resultados obtenidos, ya que el contenido de fósforo (20 %) y calcio (6 %) aportados por el fertilizante químico, fue mayor que del biol, con valores menores de fósforo (<1 ppm) y calcio (0.07 %), en ambos casos el contenido de nitrógeno fue el mismo . Adicionalmente, los niveles tienden a mejorar al tener una mayor influencia de la intensidad de luz (Urosa y Ascencio (1993), donde alcanzaron respuestas de reducción del área y espesor foliar en las plantas de soya al estar menos expuestas a la luz.

#### **4.4.3. Medición de la longitud de la raíz principal**

El análisis estadístico reveló que no hay diferencias significativas (valor  $-p = 0.4248$ ) para la longitud de las raíces de los tratamientos en comparación al control. De acuerdo a Delgado (2006), un mayor desarrollo del sistema radicular no es necesario para lograr obtener mayores respuestas en cuanto a nutrición en las plantas y que, por tanto, la aplicación de los biofermentos podría llevarse a cabo foliarmente.



#### **4.5. Análisis de variables nutricionales**

Con la determinación del contenido proteico se analizó el valor nutricional de plantas de soya con un mes de desarrollo, obteniéndose buenas respuestas en el tratamiento con la aplicación del 75% de concentración de biol (T3), donde existieron altas diferencias significativas (valor  $-p = 0.0355$ ) entre los tratamientos.

Se puso en evidencia que no fue necesario que las plantas alcancen mayores alturas para presentar un mayor valor proteico. Elizondo (2011) en estudios de la altura sobre el valor nutricional del maíz para ensilaje, encontró que al incrementar la altura, la concentración proteína cruda era menor.

De acuerdo a la Ley del Mínimo de Liebig (Thompson y Troeh, 1988), la razón de que las plantas con un mayor contenido proteico (tratamiento 75% de biol) presenten menores alturas que las plantas con un menor contenido proteico (tratamiento con 25% de biol), se basa en que el crecimiento de las plantas no está controlado por la cantidad de nutrientes disponibles, sino por el nutriente más escaso. Lo que se reflejaría en los resultados del análisis químico del suelo, donde los suelos del tratamiento con 75% de biol, mostraron un menor contenido de potasio, calcio, magnesio y zinc, en comparación al tratamiento con 25% de biol, que presentó mayores cantidades de estos elementos.

Marcy (1936) en sus estudios observó que al aplicar cantidades pequeñas de un elemento deficiente, la mayor absorción de este, aumentó proporcionalmente el

crecimiento. Sin embargo, con concentraciones mayores del elemento, la cantidad de este aumenta en la planta pero sin incrementar su crecimiento. Al aplicar fertilizantes por encima de las cantidades requeridas, suponen un derroche de nutrientes, provocando la polución en aguas subterráneas y ríos (Thompson y Troeh, 1988).

Se podría pensar que a una mayor concentración de biol (75%), el contenido de aminoácidos libres es mayor y, por ende, también el valor proteico. Por esta razón, al disponer de una solución que contenga una gran cantidad de aminoácidos libres, permitirá aportar más eficientemente a la planta los elementos necesarios para la síntesis de proteínas (Espasa, 1983).

Gran parte del nitrógeno que posee la planta de soya proviene del suelo y otra parte de la fijación simbiótica del  $N_2$  (Harper, 1974), por tal razón el 0,09% p/p del nitrógeno total (anexo O) aportado por el biol ayudó a que las plantas, especialmente las del tratamiento T3 tuviesen disponible en adecuadas cantidades a este elemento.

Efectos positivos se han obtenido en el crecimiento y rendimiento de soya por la fertilización nitrogenada. La aplicación de la fertilización es importante durante el crecimiento de plántulas para la formación de nódulos y en el desarrollo de las vainas (Harper, 1974; Hatfield *et al.*, 1974). Wood *et al.* (1994), en sus investigaciones corroboraron que la fertilización nitrogenada puede ofrecer el mayor beneficio para el crecimiento inicial y para aumentar el contenido de N en plantas.

## CAPÍTULO 5: CONCLUSIONES

- Entre los cuatro tratamientos empleados para la producción de biol, existió una diferencia significativa (valor  $-p = 0.0241$ ), siendo el biol con *Lactobacillus* el de mayor volumen de producción (30.15 L).
- El biol producido con *Lactobacillus* presentó concentraciones aceptables de nitrógeno total, con 0.09% p/p, fósforo de 1ppm, potasio con 0.15% p/p y 0.005% de hierro, manganeso, sodio y zinc, valores que según la normalización NTE INEN 211:98 se consideran aceptables para ser empleado. Para el caso de calcio y magnesio, su contenido fue bajo con valores de 0.28 y 0.33 %p/p respectivamente.
- En cuanto a la composición microbiológica inicial del biol con *Lactobacillus*, varió con el tiempo, encontrándose al término de la fermentación bacterias como *Lactobacillus paracasei*, *Serratia plymuthica*, *Pichia subpelliculosa* y *Candida diddensiae*.
- La evaluación sobre cultivos de soja de las concentraciones de 25, 50 y 75% de biol, dieron diferencias significativas (valor  $-p = 0.0002$ ) para la variable altura, siendo el tratamiento con 25% de concentración de biol (T1) el que presentó mejores respuestas, con una media de 56.80 cm, valor que supera al tratamiento químico (T4) y al control (T5) con medias de 44.29 cm y 38.30 cm respectivamente.
- Así mismo, se observó diferencias significativas (valor  $-p = 0.0001$ ) para la variable área foliar, donde el tratamiento químico (T4) alcanzó mejores valores

respecto a los tratamientos biológicos (T1, T2 y T3) y al control (T5), mostrando una media de 48.61 cm<sup>2</sup>; seguido de este, el tratamiento con el 25% de concentración de biol (T1), también dio buenos resultados con una media de 40.28 cm<sup>2</sup>, valor que supera al control (32.52 cm<sup>2</sup>).

- En cuanto a la longitud de la raíz principal no hubo diferencias significativas (valor  $-p = 0.4248$ ) entre los cinco tratamientos, sin embargo el tratamiento con el 50% de concentración de biol exhibió una media de 13.81 cm de longitud de las raíces, superando la media del tratamiento químico y control, cuyos valores respectivamente son 11.16 cm y 13.19, constituyendo el tratamiento químico, el de menor rendimiento para el crecimiento de la raíz.
- Para la variable concentración proteica, hubieron diferencias significativas (valor  $-p = 0.0355$ ), alcanzando las concentraciones proteicas más altas en el tratamiento del 75% de concentración de biol (T3) con valores de 6.35 mg/mL de proteína, superando al tratamiento químico (T4) y control (T5), con valores de 4.30 mg/mL y 5.22 mg/mL.

## **CAPÍTULO 6: RECOMENDACIONES**

- Con el fin de estudiar la dinámica de los microorganismos y la variabilidad del biol después de cesado la producción de gases, se recomienda aumentar el periodo de fermentación.
- Asimismo, analizar microbiológicamente la solución madre obtenida de las trampas de microorganismos para conocer su composición y las interacciones de los microorganismos presentes.
- Realizar una evaluación de la eficiencia del biol frente las plagas que atacan la soya.
- También se plantea evaluar el rendimiento de soya a nivel del grano producido para conocer si existen mejoras en cuanto a incremento del valor nutricional.
- Evaluar la utilización de biol como abono en otros cultivos.
- Realizar el proceso de escalado para el aprovechamiento del gas resultante.

## CAPÍTULO 7: BIBLIOGRAFÍA

- Abbott, S., Cheung, W., & Janda, M. (2003). The Genus *Aeromonas*: Biochemical Characteristics, Atypical Reactions, and Phenotypic Identification Schemes. American Society for Microbiology.
- Abellán M. (2006). La evaluación del impacto ambiental de proyectos y actividades agroforestales. Universidad de Castilla-La Mancha. España, 36
- Anderson, D., & Hairston, R. (1999). The Winogradsky column & Biofilms. *The American Biology Teacher* .
- Arriata, J. (2009). *Diversidad genética de levaduras involucradas en la fermentación del mezcal Tamaulipeco*. México: Centro de Biotecnología Genómica.
- Bautista, J., Rodríguez, F., Barrio, E., Querol, A., Garrido, A., & Arroyo, F. (2011). Exploring the yeast biodiversity of green table olive industrial fermentations for technological applications. *International Journal of Food Microbiology*, 89-96.
- Becker, M., Diekmann, K., Ladha, J., Datta, S., & Ottow, C. (1991). Effect of NPK on growth and nitrogen fixation of *Sesbania rostrata* as a green manure for lowland rice (*Oryza sativa* L.). *Plant and soil*, 149-158.
- Blanco, A., Garbisu, C., Alkorta, I., & Llama, M. (1999). Biotecnología con cianobacterias. *Investigación y ciencia*, 65-70.
- Botta, C., & Cocolin, L. (2012). Microbial dynamics and biodiversity in table olive fermentation: culture dependent and independent approaches. *Frontiers in Microbiology*, 1-10.
- Brady, N., & Weil, R. (1999). The nature and properties of soils. *Prentice-Hall*, 81.

- Burke , V., Robinson, J., Gracey, M., Peterson, D., & Partridge, K. (1984). Isolation of *Aeromonas hydrophila* from a metropolitan water supply: seasonal correlation with clinical isolates. *American Society for Microbiology*, 361–366.
- Carrillo, L. (2003). *Microbiología Agrícola*. Argentina: Universidad Nacional del Salta.
- Celeromics. (2013). *Fórmula de la cámara de Neubauer*. Recuperado el 5 de Diciembre de 2013, <http://www.celeromics.com/es/resources/Technical%20Notes/neubauer-chamber-cell-concentration/formula-camara-neubauer-concentracion-1.php>
- Contino, Y., & Ojeda, F. (2006). *Microorganismos eficientes: impacto a la agricultura y ganadería*. España: ACPA.
- Corry, J., Curtis, G., & Baird, R. (1999). Culture media for food microbiology. *Elsevier Science*, 425-426.
- Deák, T. (1992). *Experiences with the Deák and Beuchat simplified identification scheme for food borne yeasts*. Amsterdam: Elsevier.
- Delgado, V. (2006). Evaluación de la eficacia del uso de biofermentos como bioestimulantes radiculares en el cultivo orgánico de Piña Ananascomosus (Linnaeus). Costa Rica: Universidad Earth.
- Deschamps , A., Mahoudeau, G., & Lebeault, J. (1980). Fast degradation of kraft lignin by bacteria. *European Journal of Applied Microbiology and Biotechnology*, 45-51.
- Díaz, M., Padilla, C., Torres, V., González , A., Curbelo, F., & Noda A. (2003). Caracterización bromatológica de variedades de soya (Glycinemax) en producción de forrajes, forrajes integrales y granos en siembras de verano. Instituto de Ciencia Animal. *Revista cubana de ciencia agrícola*.

- Dibico. (2010). *Agar de dextrosa y papa*. Recuperado el 5 de Enero de 2014, de <http://www.dibico.com/fichast/1059.pdf>
- Eco Agricultor. (2012). *El pH del suelo, sustratos y agua*. Recuperado el 15 de Enero de 2014, de <http://www.ecoagricultor.com/2012/12/el-ph-del-suelo-sustratos-y-agua-2/>
- El Comercio. (2012). *El Comercio*. Recuperado el 11 de Febrero de 2013, de [http://www.elcomercio.com.ec/agromar/produccion-soya-tiende-desaparecer\\_0\\_799120194.html](http://www.elcomercio.com.ec/agromar/produccion-soya-tiende-desaparecer_0_799120194.html)
- Elizondo J. (2011). Influencia de la variedad y altura de cosecha sobre el rendimiento y valor nutritivo de maíz para ensilaje. *Agron. Costarricense*. Costa Rica, 105-111
- EMPROTEC. (2005). Agricultura. Recuperado el 11 de Febrero de 2013, de [www.tecnologiaem.com/agricultura.html](http://www.tecnologiaem.com/agricultura.html)
- Espasa, R. (1983). La fertilización foliar con aminoácidos. Recuperado 6 de Enero/2013 [http://www.magrama.gob.es/ministerio/pags/biblioteca/revistas/pdf\\_Hort/Hort\\_1983\\_12\\_33\\_35.pdf](http://www.magrama.gob.es/ministerio/pags/biblioteca/revistas/pdf_Hort/Hort_1983_12_33_35.pdf)
- FAO. (2013). *Manual de técnicas para laboratorio de nutrición de peces y crustáceos*. Recuperado el 10 de Diciembre de 2013, de <http://www.fao.org/docrep/field/003/AB489S/AB489S03.htm>
- Fenalce. (2010). Cultivo de soya. *Historia e importancia*. Bogotá, Colombia.
- Fernández, L., Rojas, N., Roldán, T., Ramírez, M., Zegarra, H., Uribe, R., y otros. (2006). *Manual de técnicas de análisis de suelos aplicadas a la remediación de sitios contaminados*. México: INE.
- Ferrufino, M. (2007). *Uso de Sustratos Líquidos Orgánicos Reforzados para la Fertilización en Banano*. Costa Rica: Universidad Earth.



- Freire, R. (2012). Evaluación del potencial biofertilizante de tres consorcios de cianobacterias en el crecimiento y valor nutricional de pasto Ryegrass anual (*Lolium multiflorum*) a nivel de invernadero. Quito, Ecuador.
- Frioni, L. (1999). *Biotransformación de residuos orgánicos*. Argentina: Fundación Universidad Nacional de Río Cuarto Argentina.
- GAB. (2006). *Cámara Thoma y Neubauer improved para el recuento de levaduras*. Recuperado 5 de Diciembre de 2013, [http://shop.gabsystem.com/data/descargas/Camara%20thoma%20neubauer\\_Esp.pdf](http://shop.gabsystem.com/data/descargas/Camara%20thoma%20neubauer_Esp.pdf)
- Gallardo, M. (2008). *Soja, harinas de extracción para la alimentación del ganado*. Argentina: INTA.
- Gomero, A. (2005). Los biodigestores campesinos: una innovación para aprovechar los recursos orgánicos. *Revista de Agroecología*, 26-27.
- Gómez, A., & Tovar, X. (2008). *Elaboración de un abono orgánico fermentado a partir de residuos de flores (pétalos de rosa) y su caracterización para uso en la producción de albahaca (*Ocimum basilicum* L.)*. Bogotá: Pontificia Universidad Javeriana.
- Guárdia, J. (2007). *Análisis de datos en psicología*. España: Delta Publicaciones.
- Gutiérrez, H., & De La Vara, R. (2008). *Análisis y diseño de experimentos*. México: McGraw-Hill.
- Harper, J. (1974). Soil and Symbiotic Nitrogen Requirements for Optimum Soybean Production. *Crop Science*, 255-260.
- Hatfield, J., Egli, D., Leggett, J., & Peaslee, D. (1974). Effect of Applied Nitrogen on the Nodulation and Early Growth of Soybeans (*Glycine Max* (L.) MERR.)1. *Agronomy Journal*, 112-114.

- Hazen, T., & Esch, G. (1982). ). Effect of Effluent from a Nitrogen Fertilizer Factory and a Pulp Mill on the Distribution and Abundance of *Aeromonas hydrophila* in Albemarle Sound, North Carolina. *American Society of Microbiology*, 31-42.
- INEC. (2009). *Sistema agroalimentario de la soya*. Recuperado el 11 de Febrero de 2013, de [www.ecuadorencifras.com/sistagroalim/pdf/Soya.pdf](http://www.ecuadorencifras.com/sistagroalim/pdf/Soya.pdf)
- Ishida, N., Saitoh, S., Tokuhira, K., Nagamori, E., Matsuyama, T., Kitamoto, K., y otros. (2005). Efficient production of L-Lactic acid by metabolically engineered *Saccharomyces cerevisiae* with a genome-integrated L-lactate dehydrogenase gene. *Applied and Environmental Microbiology*, 1964-1970.
- Ito, S. (2006). Caracterización y evaluación de los factores que determinan la calidad nutricional e inocuidad en la producción de fertilizantes orgánicos fermentados. Costa Rica: CATIE.
- Janda, M., & Abbott, S. (1998). Evolving Concepts Regarding the Genus *Aeromonas*: An Expanding Panorama of Species, Disease Presentations, and Unanswered Questions. *American Society for Microbiology*.
- Linares, M., & Solís, F. (2007). Identificación de levaduras. *Revista Iberoamericana de micología*, 611-877.
- López, A. (1999). Interpretación de los análisis químicos de suelos y foliares en el cultivo de banano (*Musa AAA*, CV. Valery) en costa rica. análisis de un caso y factores involucrado. *XI Congreso Nacional Agronomico/ III Congreso Nacional de Suelos*, (págs. 137-146). Costa Rica.
- Lowry, O., Rosebrough, N., Lewis, A., & Randall, R. (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. *The journal of biological chemistry*, 265-275.

- Macy P. (1936). The quantitative mineral nutrient requirement of plants. *Plant Physiol.* USA, 749-764.
- Martín, B., & Cechetti, S. (Septiembre de 2010). *Revista Agromensajes de la Facultad.* Recuperado 1 de Marzo de 2013, <http://www.fcagr.unr.edu.ar/Extension/Agromensajes/29/4AM29.htm>
- Matsui, S. (2010). The application of the probiotics principle to convert biomass into organic fertilizer. *IWA*, Japón.
- Mayo, B., Aleksandrak, T., Fernández, M., Kowalczyk, M., Álvarez, P., & Bardowski, J. (2010). *Updates in the metabolism of lactic acid bacteria.* Oxford: Wiley-Blackwell.
- Mejía, G. (1996). Digestión anaerobia. *Universidad Autónoma de México*, 5.
- Mekki, B., & Ahmed, A. (2005). Growth, yield and seed quality of soybean (*Glycine max*) as affected by organic biofertilizer and yeast application. *Research Journal of Agriculture Biological Sciences.*
- Mendoza, M. (2005). Importancia de la identificación de levaduras. *Revista de la Sociedad Venezolana de Microbiología.*
- Milera, M., Machado, R., Alonso, O., López, O., Fonte, L., Blanco, D., y otros. (2011). *La guía del criador.* España: EEPF “Indio Hatuey”.
- Molina, E. (2002). Fertilización foliar de cultivos frutícolas. Fertilización Foliar: Principios y Aplicaciones. *CIA/UCR*, 42.
- Molina, V. (2005). *Extracción de proteína foliar de maíz a los 10, 25 y 40 días de la siembra y análisis de sus aminoácidos.* Honduras: Universidad de Zamorano.
- Montgomery, D. (2004). *Diseño y análisis de experimentos.* México: Limusa.

- Mosquera, B. (Septiembre de 2010). Manual para la elaborar y aplicar abonos y plaguicidas orgánicos. *Abonos orgánicos protegen el suelo y garantizan alimentación sana*. Ecaudor : FONAG.
- Murillo, I. (2011). UCR desarrolla nueva técnica en elaboración de abonos orgánicos. *Suplemento de ciencia y tecnología*.
- Neogen. (2011). *Lactobacilli MRS Agar*. Recuperado el 14 de Noviembre de 2013, de [http://www.neogen.com/Acumedía/pdf/ProdInfo/7543\\_PI.pdf](http://www.neogen.com/Acumedía/pdf/ProdInfo/7543_PI.pdf)
- Obregón, M., Arias, V., & Durán , C. (2000). Estudio preliminar para evaluar las posibles aplicaciones del lactosuero en la agricultura. *TECNIA*, 17-19.
- Pacheco V., García , J., & Núñez M. (2011). Aislamiento y caracterización de bacterias fotótrofas de la familia Rhodospirillaceae a partir de muestras de agua obtenidas del golfo de México. *Participación de la mujer en la ciencia*. México: CIATEC.
- Pacheco, F., & Uribe, L. (2007). Lactofermentos. *RAP-AL*, 1-18.
- Patrauchan, M., & Oriel, P. (2003). la degradación de cloruro benzyldimethyl-alkylammonium por *Aeromonas hydrophila* sp. *Journal of Applied Microbiology*, 266-272.
- Picado, J., & Añazco, A. (2005). *Preparación y uso de abonos orgánicos Sólidos y líquidos*. Costa Rica: CEDECO.
- Pino, C. (2005). Determinación de la mejor dosis de Biol en el cultivo de (*Musa sapientum*) Banano, como alternativa a la fertilización foliar química. Guayaquil, Ecuador.
- Quirós, P., Albertin, A., & Blázquez, M. (2004). Elabore sus propios abonos insecticidas y repelentes orgánicos. *AVINA*, 36.
- Raven, Evert & Eichhorn. (1992). *Biología de las plantas*. Ed. Reverté. España, 518.

- Restrepo, J. (2009). Biofertilizantes preparados y fermentados a base de mierda de vaca. En J. Restrepo, & J. Hensel, *Manual práctico de Agricultura Orgánica y Panes de Piedra*. (págs. 89-90). Cali: Feriva S.A.
- Restrepo, J. (2010). *Abonos orgánicos fermentados experiencias de agricultores en Centroamérica y Brasil*. Recuperado el 20 de Abril de 2013, de <http://bocashi.files.wordpress.com/2010/10/abonosorganicosfermentados.pdf>
- Revista Líderes. (2012). *Los pastos cultivados son la mitad de los suelos*. Recuperado el 1 de Marzo de 2013, de [http://www.revistalideres.ec/informe-semanal/pastos-cultivados-mitad-suelos\\_0\\_733726627.html](http://www.revistalideres.ec/informe-semanal/pastos-cultivados-mitad-suelos_0_733726627.html)
- Ridner, E. (2006). *Valor nutricional de la soja*. Argentina: Grupo Q.S.A.
- Robalino, H. (2011). Evaluación de la Actividad Biológica y Nutricional del Biol en Diferentes Formulaciones y la Respuesta a su Aplicación en Cultivos de Arroz (*Oriza sativa*) y Maíz (*Zaemays*), en Guayas. Guayaquil, Ecuador.
- Rodríguez M. & A. Córdova. (2006). Manual de compostaje municipal. Tratamiento de residuos sólidos urbanos. México, 14-15.
- Román, P. (2012). Fenología de la soja. Recuperado el 11 de Febrero de 2013, de [www.fundacruz.org.bo](http://www.fundacruz.org.bo)
- Saltos, L. (2009). *Aprovechamiento del grano de soja para el desarrollo de alimentos funcionales*. Guayaquil: ESPOL.
- Sánchez, M. (2011). Evaluación de tres abonos orgánicos en diferentes dosis de aplicación en el rendimiento del cultivo de rosa (*Rosa sp.*) var. Freedom. Ribamba, Ecuador.
- Sierra, C. (2003). *Fertilización de cultivos y frutales en la zona norte*. Chile: INIA.

- Sigma-Aldrich. (2014). *MRS Agar (Lactobacillus Agar acc to de Man, Rogosa and Sharpe)*. Recuperado el 5 de Enero de 2014, <http://www.sigmaaldrich.com/content/dam/sigma-aldrich/docs/Fluka/Datasheet/69964dat.pdf>
- Solari, G. (2011). *Preparación de biol*. Recuperado el 14 de Octubre de 2013, de <http://practicalaction.org/biol-preparation-preparacion-de-biol>
- Succhini, G. (2013). *Abonos foliares orgánicos (biofermentos) elaborados con microorganismos de montaña*. Recuperado el 13 de Agosto de 2013, de <http://www.fundesyam.info/biblioteca/displayFicha.php?fichaID=3594>
- Schwabe W. (1951). Physiological studies in plant nutrition. XVI. The mineral nutrition of brachen. Part I. Prothallial culture and the effects of phosphorus and potassium supply on leaf production in the sporophyte. *Annals of Botany* 15: 417-446.
- Toalombo, R. (2012). *Evaluación de microorganismos eficientes autóctonos aplicados en el cultivo de cebolla blanca (Allium fistulosum)*". Ambato: Universidad Técnica de Ambato.
- Tobía, C., Villalobos, E., & Rico, E. (2006). *Uso del forraje de soja (Glycinemax L. Merr) variedad CIGRAS 06 en la nutrición de los rumiantes*. San José: Universidad Centro-occidental "Lisandro Alvarado".
- Thompson L. & F. Troeh. (1988). *Los suelos y su fertilidad*. Ed. Reverté, España.
- Urosa R. & Ascencio J. (1993). Arquitectura y caracterización fisiológica de la cobertura de plantas de soja *Glycine max* l. Merr. var júpiter en condiciones de Campo. *Agronomía Tropical*, 145-172.
- Van Niel's, C. (1944). The culture general physiology, morphology, and classification of the non-sulfur purple and brown bacteria. *Bacteriology Reviews*.

Vargas, A. (1995). *Estadística descriptiva e inferencial*. España: Universidad de Castilla.

Walpole, R., Myers, R., & Myers, S. (1999). *Probabilidad y estadística para ingenieros*. México: Pearson.

Weiland, P. (2009). *Biogas production: current state and perspectives*. Alemania: Institute Braunschweig.

Wenzl, I. (2006). La revolución de los microbios efectivos. *Integral*, 38-43.

Wood, C., Torbert, H., & Weaver, D. (1994). Nitrogen fertilizer effects on Soybean growth, yield and seed composition. *Journal production agricultural*, 354-360.