

ESCUELA POLITÉCNICA DEL EJÉRCITO

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA VIDA
INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA

USO BIOFERTILIZANTE DE DOS CULTIVOS DE
CIANOBACTERIAS, UNO AXÉNICO Y OTRO EN
CONSORCIO, A NIVEL DE INVERNADERO PARA
PRODUCCIÓN PARCIALMENTE ORGÁNICA DE FRÉJOL
Phaseolus vulgaris.

Previa la obtención de Título de:

Ingeniera en Biotecnología

ELABORADO POR:

MARÍA ALEJANDRA CRUZ SALAZAR

SANGOLQUÍ, 30 DE OCTUBRE DE 2009

HOJA DE LEGALIZACIÓN DE FIRMAS

ELABORADO POR

Alejandra Cruz

DIRECTOR DE LA CARRERA

Ingeniero Rafael Vargas

SECRETARIO ACADÉMICO

Dr. Miguel Ramírez T.

Lugar y fecha: _____

CERTIFICACIÓN

Certifico que el presente trabajo fue realizado en su totalidad por la Srta. MARIA ALEJANDRA CRUZ SALAZAR como requerimiento parcial a la obtención del título de INGENIERA EN BIOTECNOLOGÍA

Fecha

Alma Koch, MSc.
DIRECTORA

Dra. Blanca Naranjo
CODIRECTORA

DEDICATORIA

“Hay hombres que luchan un día y son buenos.

Hay otros que luchan un año y son mejores.

Hay quienes luchan muchos años y son muy buenos.

Pero hay los que luchan toda la vida: esos son los imprescindibles.”

Bertolt Brecht

Quiero dedicar mi tesis en primer lugar a mis padres que nunca me han dejado sola y que desde muy pequeña con su ejemplo y cariño me han demostrado que los sueños se alcanzan con mucho trabajo y amor.

También quiero dedicar mi tesis a una persona muy especial que ha estado conmigo en las buenas y en las malas. A mi compañero, mi mejor amigo, mi Sebas. Por apoyarme cuando el camino parece no tener fin y por enseñarme que con amor todo es posible.

Alejandra Cruz

AGRADECIMIENTO

Agradezco principalmente a Dios por ser mi guía y por poner personas buenas en mi camino, como mis padres quienes me enseñaron a luchar y ser perseverante y como mi novio Sebastián, mi mejor amigo, a quién quiero agradecer por su paciencia y por su ayuda incondicional.

Quiero agradecer especialmente a mi directora de tesis Msc. Alma Koch, y a mi codirectora Dra. Blanca Naranjo por brindarme su conocimiento, apoyo y amistad no solo durante el desarrollo de mi tesis, sino durante varios años de mi carrera universitaria. Agradezco también al Ingeniero Marco Taipe por su valioso aporte y por su tiempo en el análisis estadístico.

Finalmente agradezco a la Escuela Politécnica del Ejército por el apoyo ofrecido para la elaboración de mi tesis, en cuanto a laboratorios e insumos. De igual forma agradezco al INIAP en especial al Programa Nacional de Leguminosas por apoyar a esta investigación, proporcionando las semillas de fréjol y la cepa de *Rhizobium*.

Alejandra Cruz

ÍNDICE DE CONTENIDOS

CARÁTULA.....	i
HOJA DE LEGALIZACIÓN DE FIRMAS.....	ii
CERTIFICACIÓN.....	iii
DEDICATORIA.....	iv
AGRADECIMIENTO.....	v
ÍNDICE DE CONTENIDOS.....	vi
LISTADO DE TABLAS.....	ix
LISTADO DE CUADROS.....	x
LISTADO DE FIGURAS.....	xi
LISTADO DE ANEXOS.....	xii
RESUMEN.....	xiii
ABSTRACT.....	xiv
1. CAPÍTULO 1: INTRODUCCIÓN.....	1
1.1 Formulación del problema	1
1.2 Justificación del problema	2
1.3 Objetivos de la investigación	5
1.3.1 Objetivo general	5
1.3.2 Objetivos específicos.....	5
1.4 Marco Teórico.....	6
1.4.1 Microorganismos benéficos para la agricultura	6
1.4.2 Fijación Biológica de Nitrógeno	9
1.4.3 Cianobacterias fijadoras de nitrógeno.	11
1.4.4 <i>Rhizobium</i>	14
1.4.5 El fréjol en el Ecuador	16
1.5 Sistema de hipótesis.....	19
1.5.1 Hipótesis nula.....	19
1.5.2 Hipótesis alternativa	19
2. CAPÍTULO 2: MATERIALES Y MÉTODOS	20
2.1 Participantes	20

2.2	Zona de Estudio.....	20
2.3	Periodo de Investigación	20
2.4	Diseño	21
2.5	Procedimientos.....	23
2.5.1	Preparación de medios.....	23
2.5.2	Mantenimiento y establecimiento de los cultivos.....	23
2.5.2.1.	Cianobacterias.....	23
2.5.2.2.	Rhizobium	24
2.5.3	Preparación y esterilización del sustrato.	24
2.5.4	Desinfección y siembra de las semillas de fréjol.	26
2.5.5	Preparación y aplicación de la solución fertilizante.	27
2.5.6.	Inoculación de Rhizobium.	28
2.5.6.1.	Método de aplicación de <i>Rhizobium</i> al sustrato	29
2.5.6.2.	Método de aplicación a las semillas	30
2.5.7.	Aplicación de Cianobacterias.	31
2.5.8.	Análisis de Sobrevivencia de las cianobacterias.	32
2.5.9.	Medición de altura de las plantas de fréjol.	33
2.5.10.	Medición del área foliar de las plantas de fréjol.....	34
2.5.11.	Peso húmedo, seco y humedad relativa.....	34
2.5.12.	Costos de los reactivos de la fertilización química con nitrógeno en comparación con la fertilización con cianobacterias fijadoras de nitrógeno.	36
2.6.	Análisis de Datos.....	36
2.6.6.	Sobrevivencia de las cianobacterias.	36
2.6.7.	Medición de altura de las plantas de fréjol.	36
2.6.8.	Medición del área foliar de las plantas de fréjol.....	36
2.6.9.	Peso húmedo, peso seco y humedad relativa.....	37
2.6.10.	Crecimiento de las plantas de fréjol.....	37

3.	CAPÍTULO 3: RESULTADOS	38
3.1	Análisis de sobrevivencia	38
3.1.1	Sobrevivencia de la cepa C15 y del consorcio de cianobacterias en el sustrato.....	38
3.1.2	Sobrevivencia de las cianobacterias en las hojas.	39
3.2	Primer Cultivo de Fréjol.....	40
3.2.1	Medición de altura de las plantas de fréjol.	40
3.2.2	Medición del área foliar de las plantas de fréjol.....	44
3.2.3	Peso húmedo, seco y humedad relativa.....	45
3.2.4	Crecimiento de las plantas de fréjol.....	48
3.3	Segundo Cultivo de Fréjol	49
3.3.1	Medición de altura de las plantas de fréjol.	49
3.3.2	Medición del área foliar de las plantas de fréjol.....	53
3.3.3	Peso húmedo, peso seco y humedad relativa.....	55
3.3.4	Crecimiento de las plantas de fréjol.....	58
3.4	Costos de los reactivos de la fertilización química con nitrógeno en comparación con la fertilización con cianobacterias fijadoras de nitrógeno.	59
4.	CAPÍTULO 4: DISCUSIÓN	61
4.1	Análisis de sobrevivencia	61
4.2	Primer cultivo de fréjol	61
4.2.1	Altura de las plantas de fréjol	62
4.2.2	Área foliar de las plantas de fréjol.	65
4.2.3	Peso húmedo, seco y humedad relativa.....	66
4.3	Segundo cultivo de fréjol	66
4.3.1	Altura de las plantas de fréjol	66
4.3.2	Área foliar de las plantas de fréjol.	67
4.3.3	Peso húmedo, seco y humedad relativa.....	68

4.4	Costos de los reactivos de la fertilización química con nitrógeno en comparación con la fertilización con cianobacterias fijadoras de nitrógeno...	69
5.	CAPÍTULO 5: CONCLUSIONES.....	71
6.	CAPÍTULO 6: RECOMENDACIONES	72
7.	CAPÍTULO 7: BIBLIOGRAFÍA.....	73

LISTADO DE TABLAS

Tabla 2.1. Factores y niveles del DBCA factorial utilizado en la investigación.....	21
Tabla 2.2. Tratamientos aplicados a las plantas de fréjol.....	21
Tabla 2.3. Bloques para el primer cultivo de fréjol ubicado cámara invernadero 1	22
Tabla 2.4. Bloques para el segundo cultivo de fréjol ubicado cámara invernadero 2...	22
Tabla 3.1. Análisis de varianza para la variable altura, mes 1 del primer cultivo	40
Tabla 3.2. Prueba de Tukey para la variable altura del factor A (C15 y consorcio), durante el mes 1 del primer cultivo de fréjol	41
Tabla 3.3. Análisis de varianza para la variable altura, para el mes 2 del primer cultivo de fréjol	41
Tabla 3.4. Prueba de Tukey para la variable altura del factor B (volumen de cianobacterias), durante el mes 2 del primer cultivo de fréjol	42
Tabla 3.5. Análisis de varianza para la variable altura, para el mes 3 del primer cultivo de fréjol	42
Tabla 3.6 Análisis de varianza total para la variable altura de planta, del primer cultivo de fréjol	43
Tabla 3.7. Análisis de varianza para la variable área foliar, para el primer cultivo.....	44
Tabla 3.8. Prueba de Tukey para la variable área foliar, para el factor B (volumen de cianobacterias) del primer cultivo de fréjol.....	45
Tabla 3.9. Análisis de varianza para la variable peso húmedo del primer cultivo	46
Tabla 3.10. Análisis de varianza para la variable peso seco, para el primer cultivo.....	47
Tabla 3.11. Análisis de varianza para la altura, del mes 1 del segundo cultivo	49
Tabla 3.12. Análisis de varianza para la altura, para el mes 2 del segundo cultivo.	50
Tabla 3.13. Prueba de Tukey para la variable altura del factor C (presencia o ausencia de <i>Rhizobium</i>), durante el mes 2 del segundo cultivo de fréjol	50
Tabla 3.14. Análisis de varianza para la variable altura, para el mes 3 del segundo cultivo de fréjol	51
Tabla 3.15. Prueba de Tukey para la variable altura; para el factor B (volumen), durante el mes 3 para el segundo cultivo de fréjol.....	51

Tabla 3.16. Prueba de Tukey para la variable altura; para el factor C (presencia o ausencia de <i>Rhizobium</i>), durante el mes 3 para el segundo cultivo de fréjol.	51
Tabla 3.17. Análisis de varianza total para la variable altura de planta del segundo cultivo.....	52
Tabla 3.18. Análisis de varianza la variable área foliar del segundo cultivo de fréjol...	53
Tabla 3.19. Prueba de Tukey para la variable área foliar, para el factor B (volumen de cianobacterias) del segundo cultivo de fréjol	54
Tabla 3.20. Prueba de Tukey para la variable área foliar, para el Factor C (presencia o ausencia <i>Rhizobium</i>) del segundo cultivo de fréjol	54
Tabla 3.21. Análisis de varianza para la variable peso húmedo para el segundo cultivo	55
Tabla 3.22. Prueba de Tukey para la variable peso húmedo, para el factor A (cultivo de cianobacterias) del segundo cultivo de fréjol	56
Tabla 3.23. Prueba de Tukey para la variable peso húmedo para el Factor C (presencia o ausencia de <i>Rhizobium</i>) del segundo cultivo de fréjol.....	56
Tabla 3.24. Análisis de varianza para la variable peso seco, para el segundo cultivo	56
Tabla 3.25. Prueba de Tukey para la variable peso seco, para el factor A (cultivo de cianobacterias) del segundo cultivo de fréjol	57
Tabla 3.26. Prueba de Tukey para la variable peso seco, del factor B (volumen de cianobacterias) del segundo cultivo de fréjol	58
Tabla 3.27. Costos de los reactivos para producir 10 litros de biomasa de cianobacterias a nivel de laboratorio	59
Tabla 3.28. Costo del reactivo requerido para la elaboración de una solución química de nitrógeno nivel de laboratorio	60

LISTADO DE FIGURAS

Figura 2.1. a) Cultivo de la cepa C15, para ser aplicado a las plantas de fréjol. b) Cultivo del consorcio, para ser aplicado a las plantas de fréjol (Cruz, 2009).....	23
Figura 2.2. a) Inóculo de <i>Rhizobium</i> en tubo de ensayo con YMA. b) Cultivo de <i>Rhizobium</i> en caja petri con YMA para mantener la cepa (Cruz, 2009).....	24
Figura 2.3. Tamizado de la tierra, sustrato a ser empleado para el cultivo de las plantas de fréjol (Cruz, 2009).....	25
Figura 2.4. a) Tierra y arena en proporción 1:1, para ser empleados como sustrato. b) Mezcla del sustrato para la siembra de las semillas de fréjol (Cruz, 2009).....	25
Figura 2.5. Fundas de tela con el sustrato para ser autoclavadas, para la siembra de fréjol (Cruz, 2009).....	25
Figura 2.6. a) Llenado de las macetas con el sustrato autoclavado para la siembra de fréjol. b) Macetas con sustrato en la cámara invernadero para la siembra de fréjol (Cruz, 2009).....	26
Figura 2.7. Siembra de las semillas de fréjol a 5cm de profundidad, en cada maceta (Cruz, 2009).....	27
Figura 2.8. Macetas con las semillas de fréjol sembradas en la cámara invernadero, colocadas según el diseño experimental, para la aplicación de los tratamientos (Cruz, 2009).....	27
Figura 2.9. Frasco con caldo de cultivo YMB, donde se inoculó <i>Rhizobium</i> para ser aplicado al sustrato de las macetas con plántulas de fréjol (Cruz, 2009).....	29
Figura 2.10. Tinción Gram de <i>Rhizobium</i> : bacilos Gram negativos (Cruz, 2009).....	29
Figura 2.11. Aplicación de 40mL caldo de cultivo con <i>Rhizobium</i> (Cruz, 2009).....	30
Figura 2.12. Cultivos de <i>Rhizobium</i> en la incubadora con agitación (Cruz, 2009).....	30
Figura 2.13. a) Medio de cultivo con <i>Rhizobium</i> . b) Tinción Gram de <i>Rhizobium</i> : bacilo Gram negativo (Cruz, 2009).....	30
Figura 2.14. a) Semilla de fréjol inoculada con <i>Rhizobium</i> . b) Siembra de semillas inoculadas con <i>Rhizobium</i> en el sustrato. c) Semilla sembrada a 5cm de profundidad (Cruz, 2009).....	31
Figura 2.15. a) Aplicación de las cianobacterias al sustrato. b) Aplicación de las cianobacterias a nivel foliar a las plantas con ayuda de un rociador (Cruz, 2009).....	32
Figura 2.16. Análisis de sobrevivencia de las cianobacterias en las hojas de fréjol rociadas con cianobacterias (Cruz, 2009).....	33

Figura 2.17. Planta de fréjol cortada en pequeños pedazos para la medición de peso húmedo (Cruz, 2009).....	35
Figura 2.18. Medición del peso húmedo de la planta de fréjol en la balanza analítica (Cruz, 2009).....	35
Figura 2.19. Secado de las plantas de fréjol, correspondientes a cada tratamiento dentro de la estufa a 110°C, para la obtener el peso seco.....	35
Figura 3.1. Crecimiento de la cepa C15 en BG11 ₀ , veinte y treinta días después de la inoculación del sustrato tratado con: A. 20 mL de biomasa. B. 40 mL de biomasa (Cruz, 2009).....	38
Figura 3.2. Crecimiento del consorcio en BG11 ₀ , veinte y treinta días después de la inoculación del sustrato tratado con: A. 20 mL de biomasa. B. 40 mL de biomasa (Cruz, 2009).....	39
Figura 3.3. Crecimiento de la cepa C15 en BG11 ₀ , veinte y treinta días después de la inoculación de las hojas rociadas con: A. 20 mL de biomasa. B. 40 mL de biomasa (Cruz, 2009).....	39
Figura 3.4. Crecimiento del consorcio en BG11 ₀ , veinte y treinta días después de la inoculación de las hojas rociadas con: A. 20 mL de biomasa. B. 40 mL de biomasa (Cruz, 2009).....	40
Figura 3.5. Promedios de altura de las plantas de fréjol del factorial versus los adicionales, para cada mes del primer cultivo (Cruz, 2009).....	44
Figura 3.6. Promedios de área foliar de las plantas de fréjol del factorial versus los adicionales, del primer cultivo (Cruz, 2009).....	45
Figura 3.7. Promedios de peso húmedo de las plantas de fréjol del factorial versus los adicionales, del primer cultivo (Cruz, 2009).....	46
Figura 3.8. Promedios de peso seco de las plantas de fréjol del factorial versus los adicionales, del primer cultivo (Cruz, 2009).....	47
Figura 3.9. Curvas de crecimiento de las plantas de fréjol (factores versus los adicionales), durante los tres meses de duración de la investigación del primer cultivo (Cruz, 2009).....	48
Figura 3.10. Promedios de altura de las plantas de fréjol del factorial versus los adicionales, para cada mes del segundo cultivo (Cruz, 2009).....	53
Figura 3.11. Promedios de área foliar de las plantas de fréjol del factorial versus los adicionales del segundo cultivo (Cruz, 2009).....	54
Figura 3.12. Promedios de peso húmedo de las plantas de fréjol del factorial versus los adicionales del segundo cultivo (Cruz, 2009).....	55
Figura 3.13. Promedios de peso seco de las plantas de fréjol del factorial versus los adicionales del segundo cultivo (Cruz, 2009).....	57

Figura 3.14. Curvas de crecimiento de las plantas de fréjol (factores versus los adicionales), durante los tres meses de duración de la investigación del segundo cultivo (Cruz, 2009).....58

LISTADO DE ANEXOS

Anexo A. Obtención de la concentración de Rhizobium empleando la escala de McFarland 2.

Anexo B. Fotografías del primer cultivo de fréjol por mes y por tratamiento, en la evaluación del uso de dos cultivos de cianobacterias, uno axénico y otro en consorcio como biofertilizantes (Cruz, 2009).

Anexo C. Fotografías del segundo cultivo de fréjol por mes y por tratamiento, en la evaluación del uso de dos cultivos de cianobacterias, uno axénico y otro en consorcio como biofertilizantes (Cruz, 2009).

Anexo D. Diagrama que representa el proceso industrial de producción de fertilizantes nitrogenados vía Haber-Bosch (Moreno, 1998).

Anexo E. Cultivo de cianobacterias a diferentes escalas.

RESUMEN

El objetivo fue evaluar el uso de dos cultivos de cianobacterias, uno axénico y otro en consorcio, como biofertilizantes a nivel de invernadero, para producción parcialmente orgánica de fréjol *Phaseolus vulgaris*. Las cianobacterias fueron aplicadas al sustrato y a las hojas de las plantas ya que fijan nitrógeno a través de la enzima nitrogenasa. Se utilizó fréjol debido a su rápido crecimiento, a su adaptabilidad y a que es un grano de consumo importante en el país y en el mundo. Se usó semillas de fréjol arbustivo variedad INIAP-418 JE-MA. Se realizaron dos cultivos de fréjol con los mismos tratamientos, con diferente método de aplicación de *Rhizobium*, al sustrato y a las semillas. Se usó un Diseño de Bloques Completos al Azar (DBCA) tres factoriales, más tres adicionales.

Como resultados se obtuvo que las cianobacterias sobrevivieron en el sustrato y en las hojas de fréjol dos semanas después de su aplicación. En el primer cultivo de fréjol, fue mejor aplicar 40mL de cianobacterias que 20mL. Para el segundo cultivo de fréjol, además del volumen de cianobacterias, también la presencia o ausencia de *Rhizobium* fue significativa, demostrando que el método de aplicación de *Rhizobium* a las semillas promueve el crecimiento de las plantas de fréjol. Las cianobacterias demostraron capacidad fertilizante, tanto el cultivo axénico C15 como el consorcio de cianobacterias, ya que promovieron el crecimiento de las plántulas de fréjol, en comparación con los tratamientos adicionales (agua destilada, fertilizante químico, *Rhizobium*). Finalmente se puede decir que los tratamientos con cianobacterias produjeron mejores efectos sobre el crecimiento de las plantas de fréjol que el tratamiento con fertilizante químico.

ABSTRACT

The objective was to evaluate the use as biofertilizers, of two cyanobacteria cultures, one pure and the other in consortium, in greenhouse level, for organic production of beans *Phaseolus vulgaris*. Cyanobacteria can be applied in the soil and leaves because they fix nitrogen using the enzyme nitrogenase to convert atmospheric N₂ into ammonia. Two crops of beans INIAP-418 JE-MA variety, were proven with the same treatments, but with a difference in the *Rhizobium* application, in the soil and to the seeds. The experimental design used was a Randomized Complete Block with three factorial structures, and three additional treatments.

As result we had that cyanobacteria could survive in soil and in bean leaf without problem for almost two weeks after their application as biofertilizers. For the first crop of beans, the volume of cyanobacteria showed statistic significance, and this means that it is better to apply 40mL of cyanobacteria than 20mL. For the second crop the volume and the presence or absence of *Rhizobium* showed significance, screening that the inoculation of *Rhizobium* to the seeds promote the plant growth. Cyanobacteria promoted growth of bean plants, with the pure culture C15 or with the consortium of cyanobacteria, comparing them with the additional treatments (distilled water, chemical fertilizer and *Rhizobium*). Finally, treatments with cyanobacteria produced better effects over the growth of bean plants than the treatment with chemical fertilizer.

CAPÍTULO 1

INTRODUCCIÓN

1.1 Formulación del problema

El incremento del uso de fertilizantes químicos en la agricultura del país, sin ningún tipo de conocimiento del daño que producen al suelo de cultivo, eliminan parcial o completamente los ecosistemas microbianos que lo habitan. Este uso desmesurado e inconsciente de químicos en la agricultura ha acarreado un sinnúmero de problemas tanto a los agricultores como a los consumidores. Todo es cuestión de causa y efecto, al producirse la infertilidad del suelo, se erosiona, pierde sus nutrientes y es muy difícil producir algo en él, como consecuencia, los cultivos de plantas son cada vez más débiles, propensos a infecciones, enfermedades y plagas. En vista de ello, los agricultores mal asesorados o sin conocimiento aplican más pesticidas y químicos, sin darse cuenta que afectan a su propia salud y a la salud de las personas que van a alimentarse de sus productos. Además de los problemas de salud, también se encuentra el factor económico que es muy importante, ya que debido al uso de todos estos fertilizantes químicos el precio de los productos se incrementa afectando la economía de los consumidores y de los mismos productores, sin mencionar el daño ecológico de pérdida de la biodiversidad del suelo, en especial en el área microbiológica.

Una solución para este problema es la agricultura orgánica que en general se la conoce por el uso de técnicas apropiadas que en principio evitan el uso de fertilizantes y plaguicidas sintéticos, su propósito es llegar a una “producción agropecuaria limpia” y sostenida. En la actualidad existen varias concepciones de la agricultura orgánica, que se originan en interpretaciones filosóficas y en los diversos mecanismos o métodos que

son utilizados para la obtención de productos sanos, libre de contaminantes, y ecológicamente producidos, es decir respetando y protegiendo a la naturaleza. El sistema de producción orgánica procura potenciar los ciclos naturales de la vida, no la supresión de la naturaleza y por lo tanto es el resultado de la interacción dinámica del suelo, plantas, animales microorganismos, seres humanos y el medio ambiente. La agricultura orgánica se basa principalmente en el aprovechamiento adecuado de los recursos existentes localmente (Suquilanda, 1995).

Uno de los elementos más valiosos para la agricultura ecológica es el uso de microorganismos propios del suelo como biofertilizantes, lo cual en los sistemas productivos es una alternativa viable e importante para lograr un desarrollo agrícola ecológicamente sostenible, ya que permite una producción a bajo costo, no contamina el ambiente y mantiene la conservación del suelo desde el punto de vista de fertilidad y biodiversidad (Leyva et al., 2005).

Entre los beneficios del uso de microorganismos como por ejemplo las cianobacterias en la agricultura están: su capacidad de fijar nitrógeno atmosférico, el control de plagas y enfermedades, el aporte de nutrientes, vitaminas, hormonas y varios compuestos bioactivos que estimulan y promueven el crecimiento de las plantas (Pastorelly, 2007).

1.2 Justificación del problema

En la actualidad, el consumo de productos orgánicos en el Ecuador es limitado. Esto se debe a que en nuestra sociedad la mayoría de personas se orientan más por el precio que por la calidad del producto, por lo tanto, no se considera importante si lo que se está consumiendo es algo perjudicial para la salud. Aunque en los últimos años se ha incrementado el número de personas preocupadas por su salud, que procuran consumir

vegetales y hortalizas de sello verde, es decir que sean producidos de manera orgánica, libres de fertilizantes y pesticidas químicos.

Según el artículo “Alimentos orgánicos y sanos” presentado en el diario el “Comercio” el día 10 de mayo de 2009, los agricultores orgánicos ofertan una producción que es pequeña y mediana, puesto que ellos realizan cultivos pequeños y diversificados, ya que la siembra de algunas plantas evita la proliferación de plagas, mientras que los monocultivos extensivos solo pueden ser mantenidos mediante el uso de fertilizantes y pesticidas químicos, porque el ecosistema es más débil. A pesar de que los alimentos orgánicos en estos días se comercializan gracias al esfuerzo y trabajo de algunas asociaciones, no son suficientes para abastecer a toda la población.

Desde el punto de vista de una agricultura sostenible, el uso de biofertilizantes representa una importante alternativa para limitar el uso de fertilizante químicos, reduciendo así el impacto negativo sobre el medio ambiente y también sobre la economía de los agricultores, puesto que para producir biofertilizantes, se pueden emplear microorganismos propios del suelo o agua, que desde siempre han convivido y conviven en simbiosis o en comunidad con las plantas superiores (Sanjuán et al., 2006).

El papel de la biotecnología es desarrollar nuevas alternativas biológicas que beneficien los procesos humanos, nuestra misión es encontrar “sistemas de producción agrícola menos tóxicos como el uso de biofertilizantes que contribuirán a atenuar el uso de compuestos químicos perjudiciales además de reducir los enormes costos de remediación ambiental y la reducción en los costos de producción” (Suquilanda, 2007).

Datos obtenidos de algunos proyectos realizados en el INIAP, señalan que el principal problema de los suelos de la sierra ecuatoriana, es que se encuentran en una acelerada degradación por efecto de la erosión del suelo, causada por acción del agua, viento, y el hombre, lo que ha contribuido a la pérdida gradual de la fertilidad de los suelos y en muchos casos ha provocado la desertización; provocando que las tierras de cultivo sean pobres, especialmente en nitrógeno, y para incrementarlo, se han empleado varias alternativas, como por ejemplo, la fijación biológica de nitrógeno, al asociar simbióticamente a los cultivos de leguminosas con microorganismos propios del suelo, concretamente con bacterias del género *Rhizobium*, lamentablemente en el país no se ha podido implementar adecuadamente esta tecnología, puesto que estas bacterias requieren de condiciones específicas para sobrevivir, desde sustrato, humedad, temperatura, concentración bacteriana entre otras (Díaz, 2008).

Frente a esta información, se vió la necesidad de realizar una investigación en el área de los biofertilizantes, más específicamente utilizando cianobacterias, una alternativa económicamente sustentable para reemplazar los productos químicos, que a más de ser costosos resultan tóxicos, las cianobacterias a pesar de haber sido poco estudiadas sus aplicaciones en el campo de la agricultura, se conoce que producen efectos benéficos sobre las plantas con las que conviven (Ghosh, 2002; Unkovich et al., 2008).

Las cianobacterias pueden ser empleadas como biofertilizantes puesto que se ha demostrado que actúan como estructuradores del suelo permitiendo así la captación de nutrientes, específicamente del nitrógeno; en muchos países ya se han realizados estudios e inclusive se está comenzando a producir a escala industrial, de ahí la importancia de evaluar el efecto fertilizante de las cianobacterias en nuestro medio (Iglesias & Montero, 2005).

Para esta investigación se escogió usar fréjol para probar la acción fertilizante de las cianobacterias. El uso de estos microorganismos podría servir como alternativa para resolver el uso de nitrógeno químico, ya que estas bacterias fotosintéticas son inocuas para la salud de los humanos y además no contaminan el ambiente, al ser utilizadas para la agricultura (Ghosh, 2002).

Las cianobacterias empleadas para la investigación son nativas, lo que demuestra el gran potencial que tiene nuestro país en cuanto a biodiversidad microbiana. Es un recurso poco investigado y explotado, que podría de manera natural suplantar los químicos que tanto daño hacen a nuestros ecosistemas.

1.3 Objetivos de la investigación

1.3.1 Objetivo general

- Evaluar el uso de dos cultivos de cianobacterias, uno axénico y otro en consorcio, como biofertilizantes a nivel de invernadero, para producción parcialmente orgánica de fréjol *Phaseolus vulgaris*

1.3.2 Objetivos específicos

- Producir biomasa a partir de dos cultivos de cianobacterias, uno axénico y otro en consorcio, para ser utilizados como biofertilizantes en plántulas de fréjol.
- Obtener *Rhizobium* para ser inoculado a las plántulas fréjol según el diseño experimental.

- Sembrar las semillas de fréjol en macetas, para ser utilizadas en el estudio de la capacidad biofertilizante de los dos cultivos de cianobacterias.
- Inocular las cianobacterias y el *Rhizobium* según el diseño experimental planteado.
- Estudiar la capacidad biofertilizante de un cultivo axénico y de un consorcio de cianobacterias, en el desarrollo de plántulas de fréjol *Phaseolus vulgaris*, en macetas a nivel de invernadero.
- Analizar los costos de los reactivos para obtener una valoración del cultivo orgánico, para que este sea rentable y sostenible, en lo relativo a la fertilización de nitrógeno.

1.4 Marco Teórico

1.4.1 Microorganismos benéficos para la agricultura

Los microorganismos benéficos constituyen una parte vital de nuestro medio ambiente. El hombre los ha utilizado durante mucho tiempo, aunque no siempre comprendiendo de qué manera actúan. Por ejemplo, uno de los principios fundamentales de la revolución agrícola ha sido el de la rotación de cultivos, que permite aprovechar las bacterias del suelo para convertir el nitrógeno atmosférico en nitrógeno asimilable para las plantas. La ciencia moderna nos ha permitido comprender de qué manera ocurren procesos como éste y ha facilitado el desarrollo tecnológico que ha hecho posible la introducción de nuevos productos a la agricultura y a la biotecnología. En la era actual, en que se pone énfasis en el manejo responsable del suelo y en la sostenibilidad medioambiental, el uso de inoculantes constituye un aspecto verdaderamente promisorio (Mark et al., 2002).

La degradación de los recursos naturales es un problema evidente en varias regiones del país y debe ser evitado, o por lo menos, controlado (Santillana, 2006). Para ello es necesario buscar alternativas para incrementar las probabilidades de éxito en el establecimiento de plántulas, en especial en suelos que presenten problemas. Dentro de los requisitos indispensables para un buen establecimiento, están la rápida germinación y el rápido crecimiento de la raíz y parte aérea (Esqueda et al., 2002).

El funcionamiento de un ecosistema edáfico depende en gran medida de la actividad microbiana del suelo, dado que los microorganismos protagonizan diversas acciones que producen beneficios para las plantas a las que se asocia. Entre otras acciones, los biofertilizantes facilitan la captación de nutrientes, producen fitohormonas que favorecen el enraizamiento, protegen a la planta frente a patógenos, degradan sustancias tóxicas y mejoran la estructura del suelo. Se conoce un gran número de bacterias de vida libre o asociativa que se destacan por su potencial como biofertilizantes (Morte et al., 2004; Santillana, 2006).

La necesidad de los productores agrícolas de elevar al máximo su producción y de mejorar la calidad de su producto sumado al elevado costo de la fertilización, presentan a la inoculación o biofertilización, como una herramienta útil que puede complementar al sistema productivo. La gran variedad de especies bacterianas que pueden utilizarse para la elaboración de inoculantes es tan abundante como los beneficios que se pueden obtener con su utilización (Cossoli et al., 2008).

Dada la prioridad de aumentar las respuestas de la agricultura para la alimentación humana disminuyendo el uso de agroquímicos, las

investigaciones se han orientado hacia el desarrollo de nuevas biotecnologías. En los últimos años ha habido un interés creciente en los microorganismos benéficos del suelo, ya que estos pueden promover el crecimiento de las plantas (Peña & Reyes, 2007)

Los fertilizantes biológicos son biopreparados basados en microorganismos propios del suelo o de las plantas, pero en tasas de población mucho más altas de lo que normalmente se encuentran en la naturaleza, estos cultivos microbianos son multiplicados artificialmente a nivel de laboratorio inicialmente, para ser probados en diferentes especies de plantas en el invernadero, usando diferentes concentraciones celulares para encontrar la más efectiva, midiendo parámetros tales como altura de planta, área foliar, entre otros y en caso de obtener resultados positivos se realizaran ensayos en el campo para que posteriormente pueda ser producido a escala industrial (Ghosh, 2002; Medina & León, 2004).

La investigación realizada llegó únicamente a la multiplicación de las cianobacterias en el laboratorio las cuales fueron probadas sobre plantas de fréjol a nivel de cámara invernadero, es decir la investigación se encuentra en la primera etapa de obtención de un fertilizante biológico.

Los fertilizantes biológicos son capaces, debido a sus actividades biológicas, de suplir a las plantas directa o indirectamente, de la mayoría de nutrientes necesarios para su desarrollo, además de mejorar la fertilidad y productividad del suelo agrícola al cual son aplicados (Ghosh, 2002; Medina & León, 2004).

Los organismos y microorganismos del suelo contribuyen en un amplio rango de servicios esenciales para el funcionamiento sustentable de los ecosistemas. Actúan como los principales agentes del ciclo de nutrientes, regulando la dinámica de la materia orgánica presente en el suelo, la absorción de carbono al suelo, la emisión de gases invernadero, modificando la estructura física del suelo y el régimen del agua, incrementando la adquisición de nutrientes por parte de la vegetación e incrementando la salud de las plantas. Estos beneficios a más de ser esenciales para el funcionamiento de ecosistemas naturales, consisten en un importante recurso para el manejo sustentable de los sistemas agrícolas (FAO, 2007).

Algunos microorganismos aportan a la agricultura facilitando la captación de nutrientes presentes en el medio ambiente a través de las plantas. Un ejemplo de este aporte es la fijación biológica de nitrógeno atmosférico por parte de algunos microorganismos, específicamente por algunas bacterias y cianobacterias (Padhi & Swain, 2001)

1.4.2 Fijación Biológica de Nitrógeno

El nitrógeno gaseoso representa aproximadamente el 80% de la atmósfera terrestre. El nitrógeno es una de las claves globales de la producción agrícola, se estima que de 150 a 200 millones de toneladas de N_2 son requeridas cada año por las plantas dentro de los sistemas agrícolas, para producir el alimento mundial, alimento para animales y productos para la industria. Para cumplir en parte esta demanda 100 millones de toneladas de nitrógeno son fijadas anualmente vía industrial mediante el proceso de Haber Bosch (Unkovich et al., 2008)

El nitrógeno atmosférico es una molécula compuesta por dos átomos de nitrógeno, unidos por un triple enlace muy fuerte, y para romper dicho enlace se requieren grandes cantidades de energía, por lo que se la considera una molécula muy estable. La reacción química general ($\text{N}_2 + 3\text{H}_2 + \text{Energía} \longrightarrow 2\text{NH}_3$) de la fijación de nitrógeno es idéntica para los procesos de fijación química como biológica (Hubbell & Kidder, 2003).

La reducción de nitrógeno química o biológicamente requiere grandes cantidades de energía. El proceso químico o producción de fertilizantes nitrogenados emplea inmensas cantidades de combustibles fósiles como fuente de energía para el establecimiento de las altas temperaturas y presiones necesarias para la producción industrial, los combustibles fósiles a más de ser costos, son materiales no renovables, no biodegradables y contaminantes. La producción de fertilizante nitrogenado alcanza altos costos. Esto se debe a que el costo de los combustibles utilizados en la producción de fertilizantes nitrogenados representa entre el 70 y el 80 % del costo total (Hubbell, 2003; Ortega et al., 2004).

La fijación biológica de nitrógeno es el proceso por el cual un número de especies bacterianas utilizan la enzima nitrogenasa para convertir el nitrógeno atmosférico en amonio, una forma de nitrógeno que puede ser incorporada a componentes orgánicos como proteínas y ácidos nucleicos. De esta forma el N_2 no reactivo entra a formar parte del ciclo global del nitrógeno. Después de la fotosíntesis, la fijación de nitrógeno es probablemente el proceso biológico más importante sobre la tierra. Existe una amplia diversidad de microorganismos fijadores de N_2 , algunos pueden fijar N_2 de forma libre y otros en asociación con las plantas (Unkovich et al., 2008).

Los microorganismos simbióticos obtienen su energía de la oxidación de los carbohidratos obtenidos de las plantas, para emplearla en la reducción de N_2 a NH_3 (Hubbell, 2003). Mientras que las cianobacterias captan la energía lumínica a través de ficobilisomas, complejos proteicos exclusivos de estos procariontes, para emplearla en la fijación de nitrógeno atmosférico (Garbisu et al., 1999).

Con 3,4 billones de hectáreas de pastos, 1,4 billones de hectáreas de tierra arable y 136 millones de hectáreas de cultivos permanentes, se puede decir que la agricultura cubre aproximadamente el 40% de la superficie del suelo a nivel mundial y por ende la demanda de nitrógeno es alta. La fijación biológica de nitrógeno es capaz de contribuir directamente al incremento de producción agrícola, disminuyendo los costos (Unkovich et al., 2008).

1.4.3 Cianobacterias fijadoras de nitrógeno.

Las cianobacterias son procariontes pertenecientes al Phylum Cyanobacteria, poseen un sistema fotosintético muy similar a los eucariotes. Pueden ser unicelulares, existir como colonias o formar filamentos. Por lo general, las cianobacterias filamentosas tienen células especializadas llamados heterocistos, células redondas y con aspectos de estar más o menos vacías, que se encuentran distribuidas regularmente a lo largo del filamento o en un extremo del mismo y su función es la fijación de nitrógeno a través de la enzima nitrogenasa. De un 5 a 10% de células, pueden convertirse en heterocistos (Garbisu et al., 1999; Franco, 2004).

Algunas cianobacterias constituyen una excelente fuente de aminoácidos como aspartato, arginina y glutamato, además de vitaminas, enzimas de restricción, antibióticos lácticos y ácidos

grasos poliinsaturados (γ -linolénico), entre otros compuestos de interés económico (Franco, 2004).

Muchas cianobacterias, poseen la doble capacidad de fijar carbono y nitrógeno ya que los toman de la atmósfera en donde se encuentran en forma de gases CO_2 y N_2 , esta característica les permite desarrollarse sin problema en suelos pobres en nitrógeno. Otra gran ventaja que presentan las cianobacterias, es que tiene una amplia difusión, desde los fríos ambientes de la Antártica y el Ártico, hasta en áridos y cálidos desiertos del planeta. Se conoce que los agregados de cianobacterias, contribuyen a cementar los suelos en una capa que resiste al viento y la fuerza de arrastre del agua, proporcionan una excelente retención de la humedad y son una fuente de materia orgánica. En ambientes con una alta porción de suelo descubierto de vegetación, las cianobacterias ayudan a la protección y estabilización. Las cianobacterias son de gran importancia ecológica, ya que actúan como colonizadoras de suelos quemados, erosionados y degradados donde se desarrollan a partir de sales, agua y luz (Iglesias & Montero, 2005).

El género *Anabaena* que posee heterocistos, presenta una relación simbiótica importante con vegetales inferiores como las Briofitas, es el caso del helecho acuático *Azolla sp.*, facilitándole al mismo la captación de nitrógeno. Tomando este ejemplo de la naturaleza, se ha empleado este helecho en cultivos de arroz, incorporando de esta forma las cianobacterias al suelo, esta práctica agrícola es muy antigua, ya que se realizaba en el sudeste de Asia hace cientos de años. En el país se han realizado estudios, algunos de ellos en el litoral, se ha evaluado la simbiosis entre el helecho acuático *Azolla* y su cianobacteria, *Anabaena*, obteniendo resultados positivos. La simbiosis *Azolla-Anabaena*, aporta más de la mitad del nitrógeno necesario para el arroz, al utilizar esta asociación, el cultivo de arroz

disminuye las pérdidas de agua, nitrógeno, regula el pH y la temperatura del agua, reduce la proliferación de plantas indeseables y aumenta los rendimientos (León & Rojas, 1996; Castro et al., 2002; Iglesias & Montero, 2005; Montaña, 2005; Zaccaro, 2005).

Algunas cianobacterias de vida libre también poseen las mismas características que *Anabaena azollae*, es decir tienen la capacidad de reducir el nitrógeno atmosférico a amoníaco y de esta forma volverlo biodisponible para su absorción por parte de las plantas. Si estas cianobacterias de vida libre son aplicadas al suelo, adicionan a demás de nitrógeno promotores de crecimiento como la vitamina B₁₂, ayudan a la aireación y capacidad de retención de agua del suelo y llegan a ser parte de la biomasa del sustrato cuando las células cumplen con su ciclo vital (Ghosh, 2002).

Según García (2005) las cianobacterias pueden actuar como:

- Biofertilizantes de arrozales, por inoculación con helechos flotantes como *Azolla* conteniendo la cianobacteria *Anabaena* la cual proporciona una fijación simbiótica de nitrógeno,
- Bioestimulantes obtenidos de extractos líquidos de *Spirulina* o de microalgas,
- Estructurador de suelos, por aplicación de microalgas vivas,
- Biofertilizante, por inoculación al suelo de cianobacterias fijadoras de nitrógeno de manera no simbiótica

Las técnicas de fertilización empleando cianobacterias más conocidas en el mundo son dos: la simbiosis *Azolla-Anabaena* y con cianobacterias vivas inoculadas al suelo. En 1972 Venkataraman denominó a esta técnica **algalización**, basada en la inoculación de cianobacterias fijadoras de nitrógeno no simbióticas (*Nostoc*, *Anabaena*, *Tolypothrix*, *Cylindrospermum*, *Scytonema*, *Plectonema*) tanto en suelos agrícolas anegados, es decir suelos inundados para el cultivo de arroz;

así como no anegados. La flora cianobacteriana del suelo es muy variable y su biomasa en un suelo agrícola puede ser de 200 Kg de peso fresco/ha y, dependiendo de la estructura de suelo, pueden alcanzar los 30 cm de profundidad por poca luz que llegue (García, 2005).

1.4.4 *Rhizobium*

Como ya se ha mencionado, la fijación biológica de nitrógeno es un proceso clave en la biósfera, por el cual microorganismos portadores de la enzima nitrogenasa convierten el nitrógeno gaseoso en nitrógeno combinado. Las bacterias como *Rhizobium* inducen en las raíces de algunas leguminosas la formación de estructuras especializadas, los nódulos, dentro de los cuales el nitrógeno gaseoso es reducido a amonio. La simbiosis puede ser inhibida si existe un exceso de nitrato o amonio en el suelo (López, 2000), también se puede ver afectada si la planta huésped sufre algún tipo de estrés, por ejemplo estrés nutricional o hídrico, que se identifica por la ausencia de nódulos y poco crecimiento de la planta (Lindemann & Glover, 2003).

Las bacterias del género *Rhizobium* fijan nitrógeno atmosférico y promueven el crecimiento de las plantas. La fijación biológica del N₂ solo se observa cuando la bacteria reconoce a su hospedero. Estas bacterias son bacilos Gram negativos. Se mueven por medio de 1 a 6 flagelos que pueden ser peritricos o subpolares. Las colonias generalmente son blancas o color beige, circulares, cóncavas, semitranslúcidas u opacas y mucilaginosas; miden de 2 a 4 mm de diámetro después de 3 a 5 días de incubación en YMA (Agar Levadura Manitol). Las bacterias del género *Rhizobium* son heterótrofas o químio-organotróficas y pueden utilizar una amplia variedad de hidratos de carbono y ácidos orgánicos como fuente de carbono y energía. Son aerobios y mesófilos puesto que se desarrollan a temperaturas entre 25 a 30 °C. Pueden crecer en un

rango de pH que va desde 5 a 7 (Estévez, 1983; Wang & Martínez, 2004).

Para este estudio, interesa específicamente *Rhizobium phaseoli*, por lo que se describirá las especies de crecimiento rápido. El tiempo de reproducción de estas especies es de dos a cuatro horas, forman colonias relativamente grandes de 2 a 4mm de diámetro, incoloras o blanquecinas (Estévez, 1983).

El uso de microorganismos rizosféricos se ha llevado a la práctica mediante la inoculación de semillas. Los primeros trabajos para la bacterización de semillas fueron realizados en Rusia en 1930. A finales de los 70 se utilizó el término *rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal*. Recientemente, la denominación se extendió a microorganismos *promotoras del crecimiento vegetal* para incluir hongos y cualquier microorganismo afín (Peña & Reyes, 2007).

Aunque los inoculantes de *Rhizobium* han estado en el mercado por cerca de un siglo, sólo recientemente han aparecido las primeras preparaciones comerciales. Se reconoce que los productos biológicos han tenido una penetración de menor impacto que los pesticidas químicos en el mercado. La respuesta inmediata a la inoculación del suelo con *Rhizobium* varía considerablemente, dependiendo del tipo de bacteria, especies de plantas, tipo de suelo, densidad del inoculante y condiciones ambientales. En general, poco después de que la bacteria ha sido introducida en el suelo, su población declina progresivamente. Este fenómeno sumado a la producción de biomasa bacteriana y al estado fisiológico de la bacteria en el inoculante puede impedir la acumulación en la rizósfera de una población de *Rhizobium* lo suficientemente grande para obtener una respuesta positiva en la planta. El principal obstáculo es el hecho de que el suelo es un ambiente heterogéneo e impredecible, donde en muchos casos las bacterias

inoculadas no pueden encontrar un nicho vacío donde puedan sobrevivir, con excepción de suelos esterilizados, condición que no existe en agricultura a gran escala. En la naturaleza estas bacterias deben competir con una microflora nativa a menudo mejor adaptada y afrontar la predación por protozoarios (Díaz, 2008).

Rhizobium es capaz de estimular la germinación de las semillas y promover el crecimiento de las plantas debido a la habilidad de *Rhizobium* para producir hormonas como el ácido indol acético, ácido giberélico y citoquininas sustancias reguladoras del crecimiento vegetal(Santillana et al., 2005;).

1.4.5 El fréjol en el Ecuador

El fréjol es una especie dicotiledónea, de la familia de las fabáceas cuyo nombre científico es *Phaseolus vulgaris*. Es una de las leguminosas que más se consumen en los países de Latinoamérica (MAG, 2005 a).

El fréjol posee una gran adaptabilidad a todo tipo de suelo por lo cual ha trascendido en el planeta de tal forma que según la FAO, ocupa el octavo lugar entre las leguminosas sembradas en el planeta y por ende, una de las de mayor consumo no solo por su agradable sabor, sino también por el grado de nutrientes proteicos y calóricos que aporta (MAG, 2005 a).

Según el III Censo Agropecuario, en el Ecuador para el 2005 se cosechaban 89.789 hectáreas de las 105.127 hectáreas sembradas de esta leguminosa en grano seco y 15.241 hectáreas en verde o tierno de las 16.464 hectáreas sembradas, las que proporcionaron 18.050

toneladas métricas y 8.448 toneladas métricas respectivamente, cuyo consumo se efectúa tanto en fresco (grano seco y verde), como para la industria de enlatados (MAG, 2005 b).

El cultivo de fréjol, constituye actualmente el 0,84% del total de superficie arable en el Ecuador, según el Tercer Censo Nacional Agropecuario, de las que se logran rendimientos en promedio del orden de las 0,20 TM/ha en lo que a grano seco se refiere, mientras que en verde los rendimientos alcanzan las 0,62 TM/ha (MAG, 2005 b).

Las zonas productoras de fréjol arbustivo, se localizan tanto en valles, como en las estribaciones de la cordillera, a alturas que oscilan entre los 1.000 y 2.500 m.s.n.m. (MAG, 2005 b).

El fréjol se adapta a la mayoría de las condiciones ecológicas, por lo general crece en suelos franco arenoso-limosos o franco arcillosos con buen drenaje con pH 6,5 a 7,5. El ciclo del cultivo va de 80 a 85 días. La siembra se realiza en los meses de abril a mayo, al finalizar la época lluviosa y emplea la cantidad de 60 a 68 kilogramos de semilla por hectárea, para obtener una población de 200.000 a 300.000 plantas por hectárea (Pérez, 2000).

En este proyecto se utilizará las semillas de INIAP-418 JE.MA, variedad mejorada de fréjol arbustivo, que se caracteriza por ser una variedad, de hábito de crecimiento arbustivo indeterminado, de buen rendimiento. Esta planta presenta como características morfológicas una altura promedio de 60 a 65 cm, una flor de color rosado pastel, vaina de 11 a 12 cm de largo, el color del grano tierno es blanco/rosado y del grano seco es rojo moteado con crema En cuanto a sus características agronómicas, la floración de esta variedad se da entre los 50 a 55 días a

partir de su siembra. La cosecha en verde se da entre los 90 a 100 días, la cosecha en seco de los 115 a 120 días. El número de vainas por planta es de 12 a 13, el número de granos por vaina va de 4 a 5. Presenta buena adaptación a alturas que van de los 1800 a 2500 m.s.n.m. La variedad JE.MA es resistente a roya, antracnosis y añublo de halo. Por lo que, la variedad se presenta como una alternativa para los sistemas de producción sostenible, en el área más importante del cultivo en el país (Murillo et al., 1996).

La simbiosis entre Fréjol y *Rhizobium* proporciona aproximadamente un 50% del nitrógeno requerido por la planta. Existen factores que pueden afectar la fijación biológica del nitrógeno por parte de *Rhizobium* estos pueden ser factores ambientales y factores nutricionales (Ulloa, 1993).

Entre los factores ambientales se encuentran la temperatura la cual debe estar entre 17 y 24° C, rango que permite una buena actividad de la enzima nitrogenasa. También está la humedad del suelo, que debe contener entre un 60 a 70% de capacidad de retención de agua y el pH del suelo, que según varios autores para buenos rendimientos es de 5.5 a 6.7 (Ulloa, 1993).

Entre los factores nutricionales, los siguientes elementos químicos son esenciales para la simbiosis de Fréjol-Rhizobium: C, H, O, N, P, S, K, Ca, Mg, Fe, Mn, Cu, Zn, Mo, B; cada uno de estos nutrientes cumple roles metabólicos, fisiológicos y bioquímicos en la simbiosis (Ulloa, 1993).

Según Ulloa (1993), se han realizado estudios en cuanto al nitrógeno que demuestran que la adición de pequeñas cantidades de

nitrógeno aplicadas en el cultivo de fréjol, permiten el aumento en el crecimiento de los nódulos y de esta forma una mayor fijación de nitrógeno. Estas pequeñas cantidades varían entre 10 a 60 ppm, dependiendo de la fuente de nitrógeno por otro lado la adición de cantidades elevadas de nitrógeno al suelo, afecta el desarrollo de los nódulos disminuyendo el peso y número de los mismos, dando como resultado una menor fijación simbiótica de nitrógeno (Ulloa,1993).

1.5 Sistema de hipótesis.

1.5.1 Hipótesis nula

- Los dos cultivos de cianobacterias, tanto el consorcio como la cepa C15, tienen el mismo efecto sobre las plantas de fréjol.
- Aplicar 20 mL de cianobacterias da los mismos resultados que aplicar 40 mL de cianobacterias
- La combinación Cianobacterias-*Rhizobium* tiene el mismo efecto que las cianobacterias solas y el *Rhizobium* solo.
- Los tratamientos con cianobacterias tienen el mismo efecto que el fertilizante químico.

1.5.2 Hipótesis alternativa

- Los dos cultivos de cianobacterias tanto el consorcio como el cultivo axénico presentan diferentes efectos sobre las plántulas de fréjol.
- Aplicar 20 mL de cianobacterias no da el mismo resultado que al aplicar 40 mL de cianobacterias.
- La combinación Cianobacterias-*Rhizobium* no tiene el mismo efecto que las cianobacterias solas y el *Rhizobium* solo.
- Los tratamientos de cianobacterias no tiene el mismo efecto que el fertilizante químico.

CAPÍTULO 2

MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 Participantes

Esta investigación fue realizada en su totalidad por la señorita Alejandra Cruz, como parte del proyecto: “Aislamiento, purificación y caracterización a nivel de laboratorio de cianobacterias procedentes de bosques nativos de *Polylepis pauta* para su futura aplicación en reforestación, recuperación de suelos y extracción de metabolitos”, financiado por la Escuela Politécnica del Ejército en el año 2008. La directora de la investigación fue Alma Koch MSc, la codirectora, la Dra. Blanca Naranjo y el Biometrista el Ing. Marco Taipe.

2.2 Zona de Estudio

Las cianobacterias obtenidas del cepario del laboratorio de Microbiología fueron aisladas a partir de las hojas de *Polylepis pauta* de bosques nativos del páramo de Papallacta, Ecuador, y por el momento se encuentran en proceso de identificación, siendo la cepa C15.

Las semillas de fréjol variedad JE.MA y la cepa de *Rhizobium* (Fréjol UMR 1899) fueron donadas por el INIAP, Cutuglahua.

Los trabajos de laboratorio y cámara invernadero se llevaron a cabo en el Laboratorio de Microbiología de la Carrera de Ingeniería en Biotecnología de la Escuela Politécnica del Ejército, Sangolquí - Ecuador.

2.3 Periodo de Investigación

La investigación se realizó desde Agosto de 2008 hasta Junio de 2009.

2.4 Diseño

Se estableció un ensayo en cámaras invernadero en macetas, utilizando un DBCA factorial (2x2x2), con 3 bloques, dando un total de ocho tratamientos más tres adicionales, un testigo con agua destilada (agua destilada), un testigo con agua destilada con *Rhizobium* y otro con fertilizante químico, los factores se representan con letras mayúsculas y los niveles con letras minúsculas (Tabla 2.1).

Tabla 2.1. Factores y niveles del DBCA factorial utilizado en la investigación.

Factores	A (cianobacterias)		B (volumen cianobacterias)		C (<i>Rhizobium</i>)	
	Niveles	Cepa C15	a ₁	20 mL	b ₁	Ausencia de <i>Rhizobium</i>
	Consorcio	a ₂	40 mL	b ₂	Presencia de <i>Rhizobium</i>	c ₂

En la Tabla 2.2 se observa el diseño experimental factorial AxBxC, aplicado en la investigación, con la descripción de cada tratamiento.

Tabla 2.2. Tratamientos aplicados a las plantas de fréjol.

Tratamiento	Factorial	Descripción
t1	a1b1c1	20 mL de cepa C15
t2	a1b2c1	40 mL de cepa C15
t3	a1b1c2	20 mL de cepa C15 + <i>Rhizobium</i>
t4	a1b2c2	40 mL de cianobacterias cepa C15 + <i>Rhizobium</i>
t5	a2b1c1	20 mL de consorcio
t6	a2b2c1	40 mL de cianobacterias en consorcio
t7	a2b1c2	20 mL de cianobacterias en consorcio + <i>Rhizobium</i>
t8	a2b2c2	40 mL de cianobacterias en consorcio + <i>Rhizobium</i>
t9	Adicional	Testigo (agua destilada)
t10	Adicional	<i>Rhizobium</i>
t11	Adicional	Fertilizante químico

Los 11 tratamientos constituyeron un bloque con un total de 3 bloques, es decir, 33 observaciones por cultivo. Para el primer cultivo de fréjol, se ordenó lógicamente al bloque I y se sorteó al azar la posición de los tratamientos de los bloques II y III, como se aprecia en la Tabla 2.3

(Kuehl, 2001).

Tabla 2.3. Bloques para el primer cultivo de fréjol ubicado cámara invernadero 1.

Bloques		
I	II	III
t1	t2	t10
t2	t4	t7
t3	t1	t8
t4	t6	t1
t5	t3	t11
t6	t8	t9
t7	t10	t2
t8	t11	t5
t9	t7	t6
t10	t5	t3
t11	t9	t4

Para el segundo cultivo de fréjol, se ordenó la posición de los tratamientos igual que el primer cultivo, como se observa en la Tabla 2.4 (Kuehl, 2001).

Tabla 2.4. Bloques para el segundo cultivo de fréjol ubicado cámara invernadero 2.

Bloques		
I	II	III
t1	t4	t8
t2	t1	t7
t3	t10	t10
t4	t11	t6
t5	t8	t11
t6	t2	t9
t7	t5	t2
t8	t9	t5
t9	t7	t3
t10	t3	t4
t11	t6	t1

2.5 Procedimientos.

2.5.1 Preparación de medios

Se preparó medio BG11₀ líquido y sólido (Rippka et al., 1979), empleados en el crecimiento, mantenimiento y análisis de los cultivos de cianobacterias utilizados a lo largo de la investigación.

Se hicieron los medios agar levadura manitol (YMA) y caldo levadura manitol (YMB) para ser usados en el crecimiento y mantenimiento de *Rhizobium* (Estévez, 1983).

2.5.2 Mantenimiento y establecimiento de los cultivos.

2.5.2.1. Cianobacterias

El medio empleado para el crecimiento de las cianobacterias fue el medio BG11₀. Para obtener la biomasa y el volumen adecuados, se realizó el cultivo en frascos boeco de 1 L y de 500 mL para cada cultivo, tanto para la cepa C15 como para el consorcio, como se observa en las Figura 2.1.

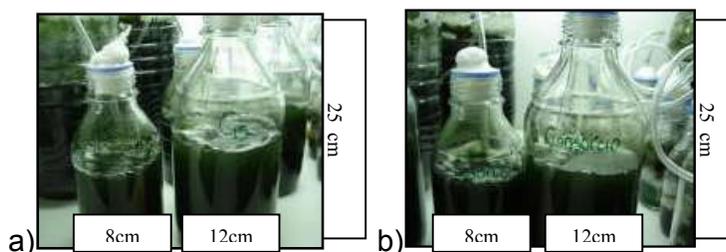


Figura 2.1. a) Cultivo de la cepa C15, para ser aplicado a las plantas de fréjol.

b) Cultivo del consorcio, para ser aplicado a las plantas de fréjol (Cruz, 2009).

Se airearon los frascos por medio de mangueras conectadas a un aireador de pecera, por el otro lado de la manguera, se insertó una pipeta pasteur de vidrio para la salida del aire al medio. Finalmente se cubrieron

los frascos con tapones estériles de algodón para evitar la contaminación del medio (Rippka et al., 1979).

2.5.2.2. Rhizobium

El inóculo de *Rhizobium* (Fréjol UMR 1899) fue sembrado en tubos con agar inclinado y en cajas petri con YMA, como se puede observar en la Figura 2.2.

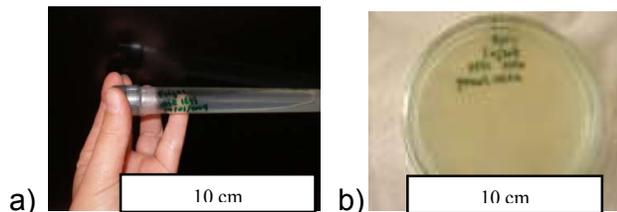


Figura 2.2. a) Inóculo de *Rhizobium* en tubo de ensayo con YMA

b) Cultivo de *Rhizobium* en caja petri con YMA para mantener la cepa (Cruz, 2009).

Se dejaron los tubos y las cajas en la incubadora a 26°C durante 7 días aproximadamente. Para mantener la cepa de *Rhizobium* se realizaron subcultivos (Estévez, 1983).

2.5.3 Preparación y esterilización del sustrato.

Se obtuvo la tierra negra en el INIAP. En la mayoría de trabajos de investigación con cianobacterias se utiliza el suelo propio del lugar por lo general son suelos de baja fertilidad natural y retención de humedad pero con excelentes condiciones físicas, sin ningún impedimento para la penetración del agua y de las raíces (Iglesias y Montero, 2005; Cossoli et al., 2008) tomando en cuenta las características de los suelos agrícolas en la sierra ecuatoriana se decidió utilizar tierra negra mezclada con arena como sustrato, al agregarle la arena se reduce la fertilidad de la tierra negra, pero se incrementa la penetración del agua y de las raíces.

Debido a que la tierra negra obtenida poseía muchas impurezas como piedras, ramas pequeñas y raíces, se procedió a tamizarla como se muestra en la Figura 2.3.



Figura 2.3. Tamizado de la tierra, sustrato a ser empleado para el cultivo de las plantas de fréjol (Cruz, 2009).

Se secó la tierra tamizada con luz solar y luz artificial en la cámara invernadero y se procedió a mezclarla con arena en proporción 1:1, como se puede apreciar en la Figura 2.4.

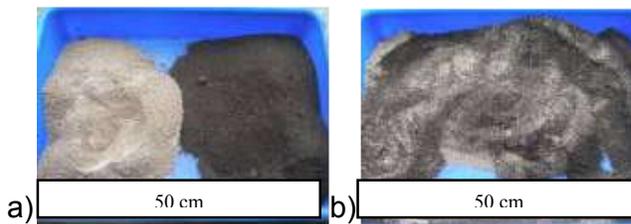


Figura 2.4. a) Tierra y arena en proporción 1:1, para ser empleados como sustrato.
b) Mezcla del sustrato para la siembra de las semillas de fréjol (Cruz, 2009).

Se introdujo el sustrato en fundas de tela (Figura 2.5).



Figura 2.5. Fundas de tela con el sustrato para ser autoclavadas, para la siembra de fréjol (Cruz, 2009).

Se autoclavaron las fundas con sustrato a 121°C, empleando el ciclo por 20 minutos de esterilización y 30 minutos de secado; dos veces

consecutivas, con 10 minutos de pausa entre ciclos.

Finalmente, se sacaron las fundas del autoclave, se las dejó enfriar y se procedió a llenar las macetas con el sustrato (Figura 2.6).

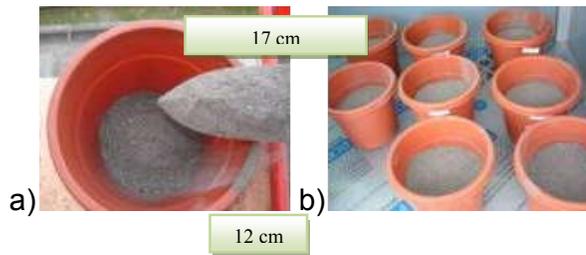


Figura 2.6.

a) Llenado de las macetas con el sustrato autoclavado para la siembra de fréjol.

b) Macetas con sustrato en la cámara invernadero para la siembra de fréjol (Cruz, 2009).

2.5.4 Desinfección y siembra de las semillas de fréjol.

Para la desinfección de las semillas, se procedió a realizar un lavado con agua destilada, luego se las sumergió en alcohol al 70% por 1 minuto, se enjuagó con agua destilada estéril y después se las sumergió en cloro al 5% durante 5 minutos (Estévez, 1983 modificado).

Inmediatamente se realizaron cinco lavados consecutivos con agua destilada estéril, dejando las semillas sumergidas en el agua del último lavado (Estévez, 1983 modificado).

Con una pinza estéril, se tomó una a una las semillas y se las colocó en la tierra de la maceta, como se observa en la Figura 2.7. Se colocaron 3 semillas por cada maceta.



Figura 2.7. Siembra de las semillas de fréjol a 5cm de profundidad, en cada maceta (Cruz, 2009).

Se cubrieron las semillas con 5 cm de tierra y se las regó con 40mL de agua destilada (Iglesias & Montero, 2005).

Se colocaron las macetas en la cámara invernadero según el diseño experimental (Figura 2.8).



Figura 2.8. Macetas con las semillas de fréjol sembradas en la cámara invernadero, colocadas según el diseño experimental, para la aplicación de los tratamientos (Cruz, 2009).

2.5.5 Preparación y aplicación de la solución fertilizante.

En la solución fertilizante no se adicionó el nitrato de calcio $[\text{Ca}(\text{NO}_3)_2]$, como fuente de nitrógeno. Se adicionó sustancias como: sulfato de potasio (K_2SO_4), fosfato ácido de potasio (KH_2PO_4), sulfato de magnesio heptahidratado ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$), sulfato ferroso heptahidratado ($\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$), cloruro de potasio (KCl), sulfato de manganeso monohidratado ($\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$), ácido bórico (H_3BO_3), sulfato de zinc heptahidratado ($\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$), sulfato de cobre pentahidratado ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) y Molibdato de Sodio (Na_2MoO_4) según Ulloa, 1993.

Se pesó la cantidad necesaria para preparar 10L de solución nutritiva, se aforó hasta 1L y se obtuvo una solución stock 10x, repartida en dos frascos Boeco de 500mL (Ulloa, 1993).

Para aplicar la solución nutritiva, se tomaron 100mL de la solución stock y se le adicionaron 900mL de agua destilada. Se aplicaron 50mL de solución nutritiva a las macetas, una vez que las semillas fueron sembradas (Ulloa, 1993).

Para el tratamiento con fertilizante químico (t11), se adicionó a la solución nutritiva el nitrato de calcio $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$.

Para el testigo con agua destilada (t9) no se aplicó solución nutritiva, ni se inocularon cianobacterias y *Rhizobium*.

2.5.6. Inoculación de Rhizobium.

Se realizaron dos cultivos de fréjol con los mismos tratamientos, pero con la diferencia fundamental del método de aplicación de *Rhizobium*. Para el primer cultivo, se utilizó el método de aplicación al sustrato (Ulloa, 1993), y para el segundo, se empleó el método de aplicación a las semillas (Santillana, 2005).

La concentración de *Rhizobium* aplicada a los tratamientos fue de $6,13 \times 10^8$ bacterias/mL, obtenida mediante espectrofotometría (Anexo A).

2.5.6.1. Método de aplicación de *Rhizobium* al sustrato

Se tomó una colonia de *Rhizobium* y se la inoculó en (YMB) caldo levadura manitol (Figura 2.9) y se incubó a 25°C, con agitación, durante 7 días aproximadamente (Estévez, 1983).



Figura 2.9. Frasco con caldo de cultivo YMB, donde se inoculó *Rhizobium* para ser aplicado al sustrato de las macetas con plántulas de fréjol (Cruz, 2009).

Una vez obtenida la cantidad suficiente de *Rhizobium*, se realizó tinción Gram y se observó al microscopio con un aumento de 100X (Figura 2.10).



Figura 2.10. Tinción Gram de *Rhizobium*: bacilos Gram negativos (Cruz, 2009).

Finalmente y de manera aséptica, se procedió a inocular 40 mL del caldo levadura manitol con *Rhizobium* en las macetas (Ulloa, 1993), según el diseño experimental (Figura 2.11).



Figura 2.11. Aplicación de 40mL caldo de cultivo con *Rhizobium* (Cruz, 2009).

2.5.6.2. Método de aplicación a las semillas

Se inoculó una colonia de *Rhizobium* en YMB (Caldo Levadura Manitol) y se incubó a 25°C, con agitación (Figura 2.12), durante 7 días aproximadamente (Estévez, 1983).



Figura 2.12. Cultivos de *Rhizobium* en la incubadora con agitación (Cruz, 2009).

Una vez obtenida la cantidad suficiente de *Rhizobium*, se realizó tinción Gram (Figura 2.13).

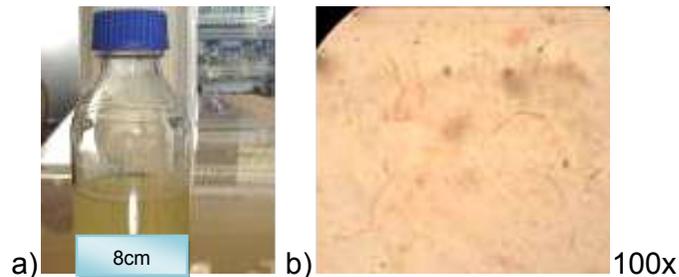


Figura 2.13. a) Medio de cultivo con *Rhizobium*.

b) Tinción Gram de *Rhizobium*: bacilo Gram negativo (Cruz, 2009).

Después de confirmar la presencia de *Rhizobium* en el medio, se tomaron las semillas estériles y se las sumergió en el medio durante

24 horas. Transcurrido este tiempo, se extrajeron una a una, las semillas empleando una pinza estéril y se las sembró en la maceta, como se observa en la Figura 2.14 (Santillana, 2005).

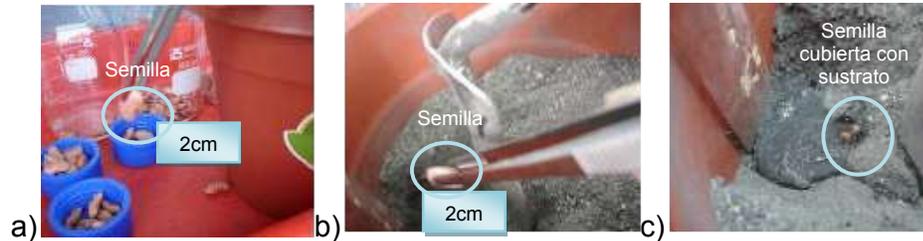


Figura 2.14. a) Semilla de fréjol inoculada con *Rhizobium*.
b) Siembra de semillas inoculadas con *Rhizobium* en el sustrato.
c) Semilla sembrada a 5cm de profundidad (Cruz, 2009).

2.5.7. Aplicación de Cianobacterias.

Para la aplicación de las cianobacterias, se tomó en cuenta el diseño experimental planteado en la Tabla 1.

De cada cultivo de cianobacterias, se tomó el volumen requerido para las aplicaciones. De cada tratamiento se hicieron tres repeticiones. Los tratamientos con cianobacterias fueron cuatro, dando en total doce tubos por cepa (C15 y consorcio: 20 mL y 40 mL).

Se obtuvo el número celular de cianobacterias en los dos cultivos mediante conteo en cámara de Nuebauer, para el consorcio y para la cepa C15 fue de $7,01 \times 10^7$ células/mL, aproximadamente.

Se aplicaron las cianobacterias a las plantas en la cámara invernadero de la siguiente manera:

Para los tratamientos de 20 mL, se aplicaron 10 mL en el sustrato como indica la Figura 2.15.a) y 10 mL fueron rociados a las hojas como se observa en la Figura 2.15.b)

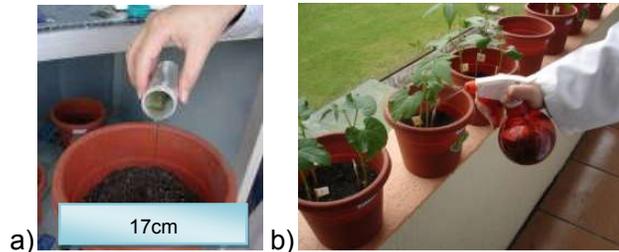


Figura 2.15.a) Aplicación de las cianobacterias al sustrato.

b) Aplicación de las cianobacterias a nivel foliar a las plantas con ayuda de un rociador (Cruz, 2009).

Para el tratamiento de 40 mL, se aplicaron 20 mL en el sustrato como se aprecia en la Figura 2.15.a) y los otros 20 mL fueron rociados foliarmente, como podemos ver en la Figura 2.15.b).

Se realizaron las aplicaciones de cianobacterias a las plantas cada dos semanas, durante todo el periodo de cultivo (Iglesias & Montero, 2005)

2.5.8. Análisis de Supervivencia de las cianobacterias.

Se realizó la evaluación de la supervivencia tanto para C15 como para el consorcio de cianobacterias y para cada uno de sus tratamientos, tanto en sustrato como en hojas.

2.5.8.1. Análisis de supervivencia de las cianobacterias en el sustrato.

Se tomó aproximadamente 1 g del sustrato donde previamente fueron aplicadas las cianobacterias con ayuda de una espátula estéril. La muestra de sustrato fue tomada dos semanas después de la primera

aplicación de las cianobacterias. Se colocó la muestra de sustrato en una caja petri con medio BG11₀ sólido y se la incubó en la cámara con luz artificial.

Este ensayo duró 30 días, tiempo necesario para comprobar si las cianobacterias sobrevivieron en el sustrato mediante la observación de crecimiento en el medio.

2.5.8.2. Análisis de sobrevivencia de las cianobacterias en las hojas.

Con una pinza estéril se sujetó la punta de una hoja, se cortó con la tijera un pedazo pequeño y se lo colocó en caja petri con medio BG11₀ sólido y se la ubicó en la cámara de incubación (Figura 2.16) durante 30 días. Se tomó la muestra de hoja dos semanas después de la aplicación foliar de las cianobacterias del cultivo axénico C15 y del consorcio.

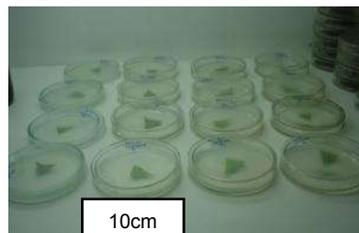


Figura 2.16. Análisis de sobrevivencia de las cianobacterias en las hojas de fréjol rociadas con cianobacterias (Cruz, 2009).

2.5.9. Medición de altura de las plantas de fréjol.

Aproximadamente dos semanas después de la siembra, emergieron las primeras plantas de fréjol, por lo tanto las mediciones de altura se realizaron desde la tercera semana una vez que más del 50% de las macetas tenían plantas con la hoja unifoliada desplegada (Estévez, 1983; Iglesias & Montero, 2005).

Se realizó la medición desde el nivel del sustrato en la maceta hasta la punta del tallo donde empieza la última unión de hojas (Estévez, 1983).

Cada tratamiento tuvo tres repeticiones, es decir tres macetas. En cada maceta crecieron tres plantas, de las que se midió la altura cada semana durante tres meses.

2.5.10. Medición del área foliar de las plantas de fréjol.

Usando una hoja milimetrada como plantilla, se marcó cada centímetro en una hoja de acetato transparente (Estévez, 1983).

Se colocó la hoja de acetato marcada encima de una hoja de la planta y se contaron los puntos sobre ella. Estos puntos fueron los centímetros cuadrados que midió la hoja (Estévez, 1983).

Se realizó la medición de área foliar aproximadamente a los 40 días de sembradas las semillas de fréjol. El objetivo fue comparar las áreas entre los diferentes tratamientos (Christopher et al., 2007).

2.5.11. Peso húmedo, seco y humedad relativa.

Para conocer el peso húmedo se cortó una planta de fréjol entera en pedazos pequeños excluyendo la raíz, como se puede observar en la Figura 2.17.

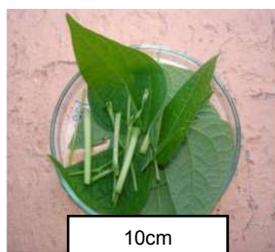


Figura 2.17. Planta de fréjol cortada en pequeños pedazos para la medición de peso húmedo (Cruz, 2009).

Se colocó una base de caja petri en la balanza analítica, se encerró la balanza y se pesaron las plantas (Figura 2.18). Este valor constituyó el peso húmedo (Estévez, 1983).



Figura 2.18. Medición del peso húmedo de la planta de fréjol en la balanza analítica (Cruz, 2009).

Después de haber obtenido el peso húmedo de la planta, se la secó en la estufa a 110°C (Figura 2.19). Se pesó en la balanza analítica siguiendo el mismo procedimiento que se usó para obtener el peso húmedo (Estévez, 1983).

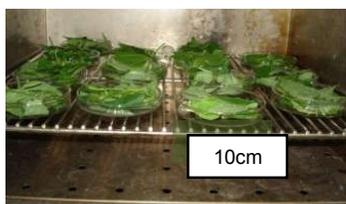


Figura 2.19. Secado de las plantas de fréjol, correspondientes a cada tratamiento dentro de la estufa a 110°C, para la obtener el peso seco.

Con los resultados obtenidos se calculó la humedad relativa de cada planta, mediante la siguiente fórmula (Estévez, 1983).

$$\text{Hr (humedad relativa)} = 100 - \left(\frac{g.muestra\ seca}{g.muestra\ humeda} * 100 \right)$$

2.5.12. Costos de los reactivos de la fertilización química con nitrógeno en comparación con la fertilización con cianobacterias fijadoras de nitrógeno.

Se recopilaron los precios de los reactivos empleadas en la elaboración del medio de cultivo BG11₀ donde crecieron las cianobacterias. De igual manera se procedió con el reactivo químico para la elaboración de la solución química de nitrógeno. Finalmente se compararon los dos valores y se observó cual resultó más económico.

2.6. Análisis de Datos

2.6.6. Supervivencia de las cianobacterias.

La evaluación de la supervivencia de las cianobacterias, tanto en el sustrato como en las hojas, consistió en observar la presencia o la ausencia de crecimiento sobre el medio de cultivo en donde se inoculó el sustrato o las hojas previamente tratados con las cianobacterias.

2.6.7. Medición de altura de las plantas de fréjol.

Se utilizó el software estadístico SAS.9, con el cual se realizó el análisis de varianza y las pruebas de significancia de Tukey.

2.6.8. Medición del área foliar de las plantas de fréjol.

Se realizó un análisis de varianza y la prueba de significancia de Tukey con ayuda del programa estadístico SAS.9.

2.6.9. Peso húmedo, peso seco y humedad relativa.

Se realizó análisis de varianza y pruebas de Tukey en el programa SAS.9. y se determinó el porcentaje de humedad relativa entre las plantas de fréjol.

2.6.10. Crecimiento de las plantas de fréjol.

Se realizaron curvas de crecimiento mensuales de la altura de las plantas de fréjol.

CAPÍTULO 3

RESULTADOS

3.1 Análisis de sobrevivencia

3.1.1 Sobrevivencia de la cepa C15 y del consorcio de cianobacterias en el sustrato.

Se observó crecimiento de la cepa C15 alrededor del sustrato tratado con 20 mL y con 40 mL de biomasa, veinte días después de su inoculación en el medio BG11₀, tiempo normalmente requerido para el crecimiento de las cianobacterias en el laboratorio (Figuras 3.1.A y B).

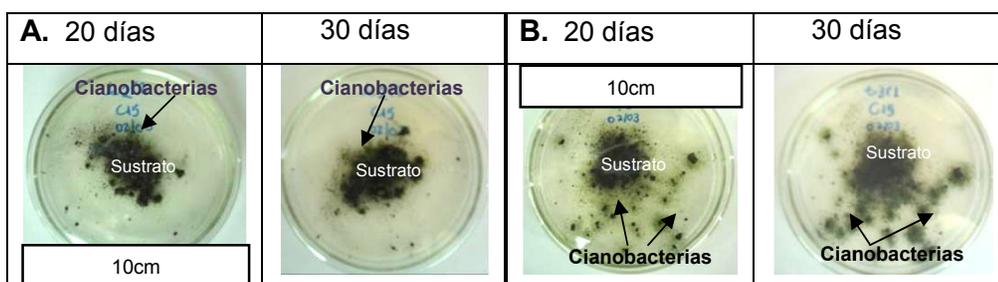


Figura 3.1. Crecimiento de la cepa C15 en BG11₀, veinte y treinta días después de la inoculación del sustrato tratado con:

A. 20 mL de biomasa.

B. 40 mL de biomasa (Cruz, 2009).

La sobrevivencia del consorcio aplicado al sustrato se hizo evidente aproximadamente veinte días después, tiempo normalmente requerido para el crecimiento de las cianobacterias en BG11₀ en el laboratorio, tanto en la aplicación de 20 mL como de 40 mL de biomasa (Figuras 3.2.A y B).

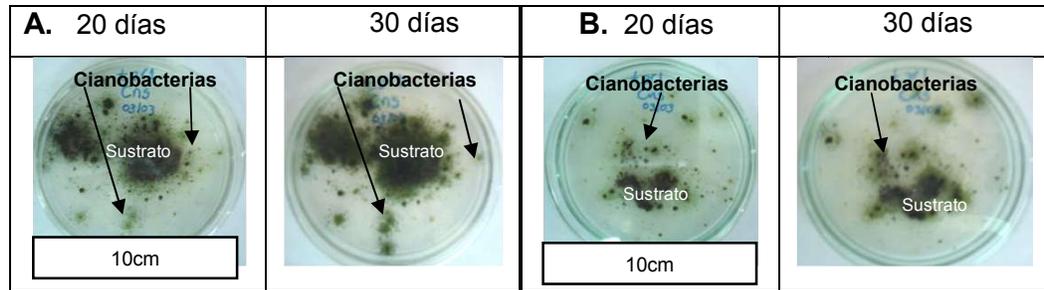


Figura 3.2. Crecimiento del consorcio en BG11₀, veinte y treinta días después de la inoculación del sustrato tratado con:

A. 20 mL de biomasa.

B. 40 mL de biomasa (Cruz, 2009).

3.1.2 Supervivencia de las cianobacterias en las hojas.

Se confirmó la supervivencia de la cepa C15 en las hojas debido a que se observó crecimiento veinte días después de haber sido colocadas las hojas tratadas con 20 mL y con 40 mL de biomasa en BG11₀ (Figuras 3.3.A y B).

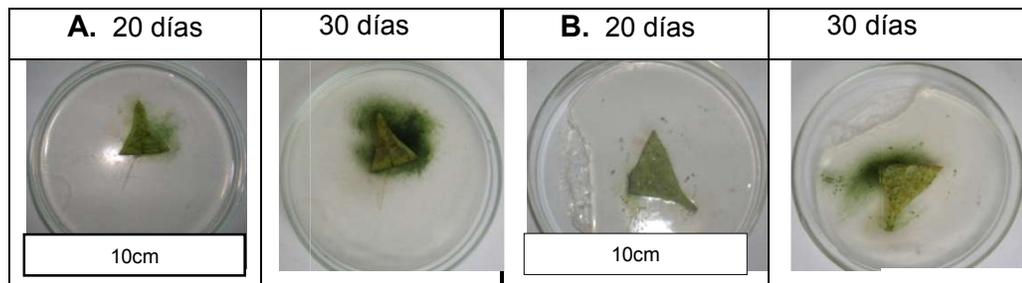


Figura 3.3. Crecimiento de la cepa C15 en BG11₀, veinte y treinta días después de la inoculación de las hojas rociadas con:

A. 20 mL de biomasa.

B. 40 mL de biomasa (Cruz, 2009).

Se verificó la presencia del consorcio viable ya que se observó crecimiento veinte días después de haber sido colocadas las hojas tratadas tanto con 20 mL como con 40 mL de biomasa en BG11₀ (Figuras 3.4.A y B).

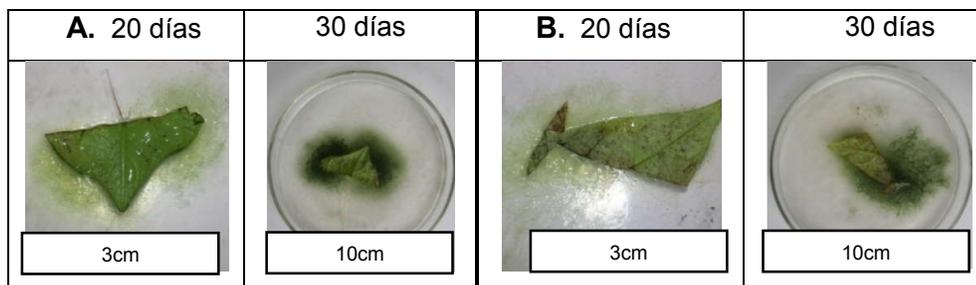


Figura 3.4. Crecimiento del consorcio en BG11₀, veinte y treinta días después de la inoculación de las hojas rociadas con:

A. 20 mL de biomasa.

B. 40 mL de biomasa (Cruz, 2009).

3.2 Primer Cultivo de Fréjol.

3.2.1 Medición de altura de las plantas de fréjol.

Análisis estadístico de los datos de la medición de altura de las plantas de fréjol en el mes 1 del primer cultivo.

En el primer mes de desarrollo de las plantas de fréjol, se puede notar que para la variable altura de planta no existió significación estadística para la mayoría de las fuentes de variabilidad investigadas, exceptuado el factorial versus los adicionales que fue altamente significativo y el factor A (cultivo de cianobacterias) que fue significativo (Tabla 3.1).

Tabla 3.1. Análisis de varianza para la variable altura, mes 1 del primer cultivo.

Fuente de Variabilidad	G.L	Suma de Cuadrados	Cuadrado de la Media	F-Valor	Pr > F
Total	32	415,88			
Tratamientos	10	268,68	26,86	3,76	0,005
A (cultivos cianobacterias)	1	19,80	19,80	4,53	0,049
B (volumen cianobacterias)	1	9,63	9,63	2,20	0,157
A*B	1	0,06	0,06	0,01	0,908
C (con o sin <i>Rhizobium</i>)	1	1,60	1,60	0,37	0,553
A*C	1	6,20	6,20	1,42	0,251
B*C	1	0,01	0,01	0,00	0,969
A*B*C (Factorial)	1	0,01	0,01	0,00	0,969
Factorial versus Adicionales	1	226,26	226,26	31,70	<,00001
Ad1 versus Ad2 Ad3	1	0,09	0,09	0,01	0,909
Ad2 versus Ad3	1	16,33	16,33	2,29	0,146
Bloques	2	4,46	2,23	0,31	0,735
Error Experimental	20	142,74	7,13		

Al realizar la prueba de Tukey (Tabla 3.2), para el factor A (cultivo de cianobacterias) se encontraron dos rangos, donde C15 tiene el mejor promedio y se sitúa en el primer rango.

Tabla 3.2. Prueba de Tukey para la variable altura del factor A (C15 y consorcio), durante el mes 1 del primer cultivo de fréjol.

Niveles factor A (cultivo de cianobacterias)		Media	Rango de significancia	
a ₁	C15	12,72	a	
a ₂	Consorcio	10,90		b

Análisis estadístico de los datos de la medición de altura de las plantas de fréjol en el mes 2 del primer cultivo.

En el segundo mes de desarrollo de las plantas de fréjol, se aprecia que para la variable altura de planta no se encontró significación estadística para la mayoría de las fuentes de variabilidad investigadas, excepto para el factorial versus los adicionales que fue altamente significativo y el factor B (volumen de cianobacterias) que fue significativo (Tabla 3.3).

Tabla 3.3. Análisis de varianza para la variable altura, para el mes 2 del primer cultivo de fréjol.

Fuente de Variabilidad	G.L	Suma de Cuadrados	Cuadrado de la Media	F-Valor	Pr > F
Total	32	751,9			
Tratamientos	10	524,2	52,42	7,97	<,00001
A (cultivos cianobacterias)	1	28,60	28,60	2,17	0,159
B (volumen cianobacterias)	1	137,2	137,28	10,44	0,005
A*B	1	0,88	0,88	0,07	0,799
C (con o sin <i>Rhizobium</i>)	1	0,11	0,11	0,01	0,929
A*C	1	2,94	2,94	0,22	0,643
B*C	1	2,16	2,16	0,16	0,691
A*B*C	1	22,43	22,43	1,71	0,210
Factorial versus Adicionales	1	323,76	323,76	49,20	<,00001
Ad1 versus Ad2 Ad3	1	14,40	14,40	2,19	0,154
Ad2 versus Ad3	1	5,04	5,04	0,77	0,392
Bloques	2	96,13	48,07	7,30	0,004
Error Experimental	20	131,6	6,58		

En la prueba de Tukey (Tabla 3.4), para el factor B (volumen de cianobacterias) se observaron dos rangos, donde el volumen de 40 mL tiene el mejor promedio de altura y se encuentra en el primer rango.

Tabla 3.4. Prueba de Tukey para la variable altura del factor B (volumen de cianobacterias), durante el mes 2 del primer cultivo de fréjol.

Niveles factor B (volumen de cianobacterias)		Media	Rango de Significancia	
b ₂	40 mL	26,43	a	
b ₁	20 mL	21,65		b

Análisis estadístico de los datos de la medición de altura de las plantas de fréjol en el mes 3 del primer cultivo.

En el tercer mes de desarrollo de las plantas de fréjol, para la variable altura de planta, al analizar el volumen de cianobacterias, cultivo de cianobacterias y *Rhizobium* no se halló significación estadística para las fuentes de variabilidad investigadas, con excepción del factorial versus los adicionales que fue altamente significativo (Tabla 3.5).

Tabla 3.5. Análisis de varianza para la variable altura, para el mes 3 del primer cultivo de fréjol.

Fuente de Variabilidad	G.L	Suma de Cuadrados	Cuadrado de la Media	F-Valor	Pr > F
Total	32	2587,05			
Tratamientos	10	1756,46	175,65	5,56	<,00001
A (cultivos cianobacterias)	1	4,50	4,50	0,10	0,758
B (volumen cianobacterias)	1	176,04	176,04	3,81	0,068
A*B	1	3,68	3,68	0,08	0,781
C (con o sin <i>Rhizobium</i>)	1	0,88	0,88	0,02	0,892
A*C	1	55,82	55,82	1,21	0,288
B*C	1	0,54	0,54	0,01	0,915
A*B*C	1	83,63	83,63	1,81	0,197
Factorial versus Adicionales	1	1420,07	1420,07	44,9	<,00001
Ad1 versus Ad2 Ad3	1	36,98	36,98	1,17	0,292
Ad2 versus Ad3	1	30,83	30,83	0,98	0,335
Bloques	2	198,38	99,19	3,14	0,065
Error Experimental	20	632,21	31,61		

Análisis estadístico total de los datos de la medición de altura de las plantas de fréjol del primer cultivo.

En el análisis de varianza total del desarrollo de las plantas de fréjol del primer cultivo, se observa que para la variable altura de planta, al evaluar el volumen de cianobacterias, cultivo de cianobacterias y *Rhizobium* no se encontró significación estadística para las fuentes de variabilidad investigadas, excepto para el factorial versus los adicionales que fue altamente significativo (Tabla 3.6).

Tabla 3.6 Análisis de varianza total para la variable altura de planta del primer cultivo de fréjol.

Fuente de Variabilidad	G.L	Suma de Cuadrados	Cuadrado de la Media	F-Valor	Pr > F
Total	98	16260,95			
Tratamientos	10	2059,13	205,91	1,26	0,26
A (cultivos cianobacterias)	1	47,36	47,36	0,25	0,61
B (volumen cianobacterias)	1	262,96	262,96	1,40	0,24
A*B	1	0,18	0,18	0,00	0,97
C (con o sin <i>Rhizobium</i>)	1	2,13	2,13	0,01	0,91
A*C	1	3,55	3,55	0,02	0,89
B*C	1	0,22	0,22	0,00	0,97
A*B*C	1	64,98	64,98	0,35	0,55
Factorial versus. adicionales	1	1667,06	1667,06	10,20	0,002
Ad1 versus. Ad2 Ad3	1	34,56	34,56	0,21	0,64
Ad2 versus. Ad3	1	46,72	46,72	0,29	0,59
Bloques	2	152,88	76,44	0,47	0,62
Error Experimental	86	14048,93	163,35		

El factorial, es decir la combinación de los tres factores, A (cianobacterias: C15 o consorcio), B (volumen de cianobacterias: 40 mL o 20 mL) y C (ausencia y presencia de *Rhizobium*) versus los tratamientos adicionales, presentaron alta significancia durante el periodo de desarrollo del primer cultivo de fréjol. El factorial tuvo mejores promedios de altura de las plantas que los tratamientos adicionales: testigo con agua destilada, *Rhizobium* y el fertilizante químico (Figura 3.5).

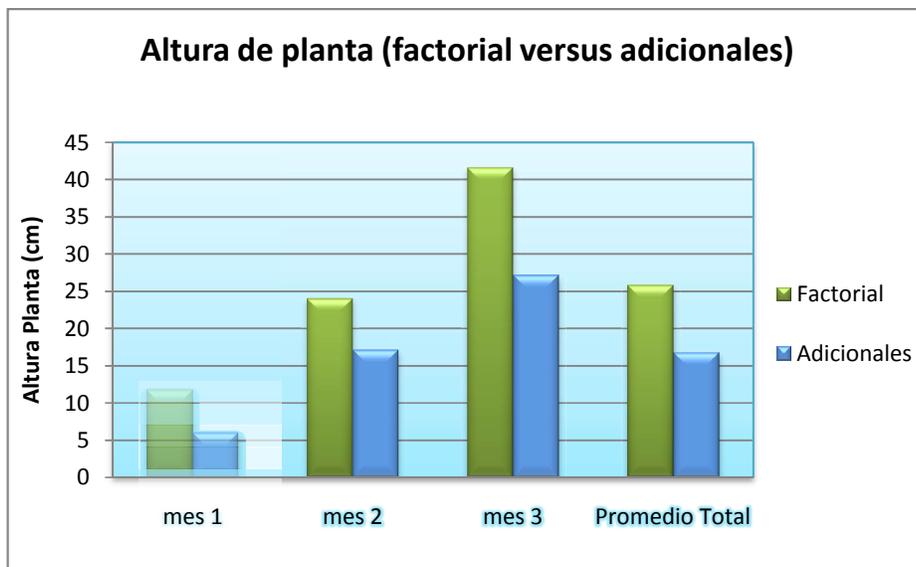


Figura 3.5. Promedios de altura de las plantas de fréjol del factorial versus los adicionales, para cada mes del primer cultivo (Cruz, 2009).

3.2.2 Medición del área foliar de las plantas de fréjol.

Se aprecia que para la variable área foliar no se observó significación estadística para las fuentes de variabilidad investigadas, excepto para el factorial versus los adicionales que fue altamente significativo y el factor B (volumen de cianobacterias) que es significativo (Tabla 3.7).

Tabla 3.7. Análisis de varianza para la variable área foliar, para el primer cultivo.

Fuente de Variabilidad	G.L	Suma de Cuadrados	Cuadrado de la Media	F-Valor	Pr > F
Total	32	1708,02			
Tratamientos	10	1182,67	118,2	5,28	0,01
A (cultivos cianobacterias)	1	25,69	25,69	1,17	0,29
B (volumen cianobacterias)	1	235,42	235,4	10,7	0,01
A*B	1	5,51	5,51	0,25	0,62
C (con o sin <i>Rhizobium</i>)	1	16,39	16,39	0,75	0,40
A*C	1	4,89	4,89	0,22	0,64
B*C	1	7,22	7,22	0,33	0,57
A*B*C	1	10,89	10,89	0,50	0,49
Factorial versus Adicionales	1	865,93	865,9	38,6	<,00001
Ad1 versus Ad2 Ad3	1	13,63	13,63	0,61	0,44
Ad2 versus Ad3	1	44,46	44,46	1,99	0,17
Bloques	2	78,35	39,18	1,75	0,19
Error Experimental	20	447,92	22,39		

Los tratamientos del factorial tuvieron mejores promedios en cuanto al área foliar de las plantas que los tratamientos adicionales: testigo con agua destilada, *Rhizobium* y el fertilizante químico (Figura 3.6).

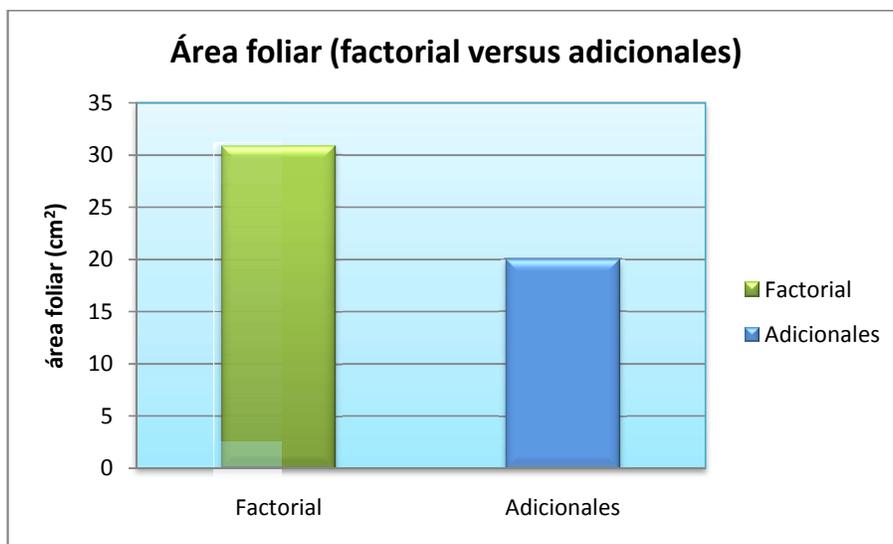


Figura 3.6. Promedios de área foliar de las plantas de fréjol del factorial versus los adicionales, del primer cultivo (Cruz, 2009).

En la prueba de Tukey (Tabla 3.8), para el factor B (volumen de cianobacterias) se encontraron dos rangos, donde el volumen de 40 mL tiene el mejor promedio ya que se sitúa en el primer rango.

Tabla 3.8. Prueba de Tukey para la variable área foliar, para el factor B (volumen de cianobacterias) del primer cultivo de fréjol.

Niveles Factor B (volumen cianobacterias)		Media	Rango de significancia	
b ₂	40 mL	34,28	a	
b ₁	20 mL	28,01		b

3.2.3 Peso húmedo, seco y humedad relativa.

La variable peso húmedo de planta no mostró significación estadística para la mayoría de las fuentes de variabilidad investigadas, con excepción del factorial versus los adicionales que fue altamente significativo (Tabla 3.9).

Tabla 3.9. Análisis de varianza para la variable peso húmedo del primer cultivo.

Fuente de Variabilidad	G.L	Suma de Cuadrados	Cuadrado de la Media	F-Valor	Pr > F
Total	21	29,95			
Tratamientos	10	20,74	2,07	3,06	0,04
A (cultivos cianobacterias)	1	0,05	0,05	0,06	0,82
B (volumen cianobacterias)	1	3,11	3,11	3,23	0,11
A*B	1	0,12	0,12	0,13	0,72
C (con o sin <i>Rhizobium</i>)	1	0,93	0,93	0,97	0,35
A*C	1	2,78	2,78	2,88	0,12
B*C	1	0,16	0,16	0,17	0,68
A*B*C	1	0,38	0,38	0,39	0,55
Factorial versus Adicionales	1	12,51	12,51	18,46	0,001
Ad1 versus Ad2 Ad3	1	1,14	1,14	1,68	0,22
Ad2 versus Ad3	1	0,07	0,07	0,12	0,74
Repetición	1	2,43	2,43	3,60	0,08
Error Experimental	10	6,77	0,67		

En relación al peso húmedo de las plantas de fréjol, los tratamientos del factorial presentaron mayores pesos que los tratamientos adicionales: testigo con agua destilada, *Rhizobium* y el fertilizante químico (Figura 3.7).

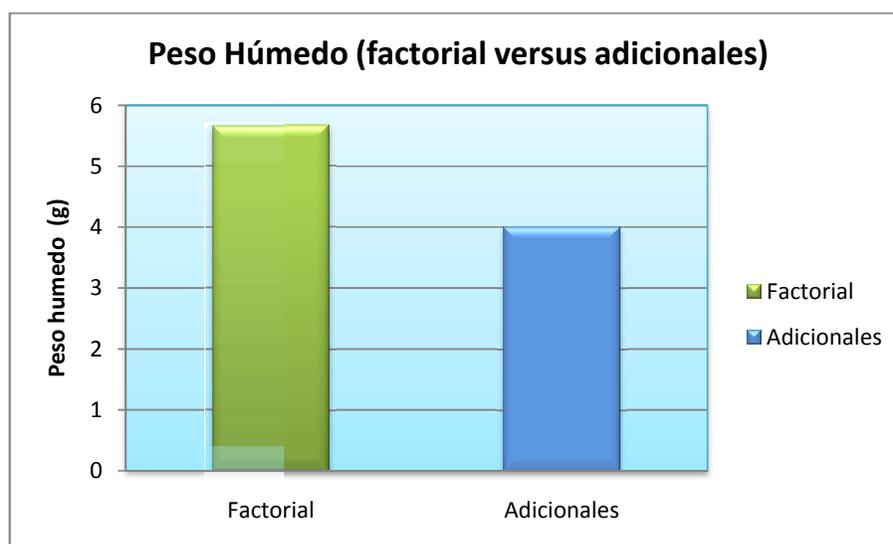


Figura 3.7. Promedios de peso húmedo de las plantas de fréjol del factorial versus los adicionales, del primer cultivo (Cruz, 2009).

Se observa que para la variable peso seco de planta, no hubo significación estadística para las fuentes de variabilidad investigadas, exceptuado el factorial versus los adicionales que fue altamente significativo (Tabla 3.10).

Tabla 3.10. Análisis de varianza para la variable peso seco, para el primer cultivo.

Fuente de Variabilidad	G.L	Suma de Cuadrados	Cuadrado de la Media	F-Valor	Pr > F
Total	21	0,40			
Tratamientos	10	0,28	0,02	2,82	0,06
A (cultivos cianobacterias)	1	0,02	0,02	1,65	0,23
B (volumen cianobacterias)	1	0,06	0,06	5,20	0,05
A*B	1	0,00	0,00	0,23	0,64
C (con o sin <i>Rhizobium</i>)	1	0,03	0,03	2,94	0,12
A*C	1	0,03	0,03	2,49	0,15
B*C	1	0,00	0,00	0,09	0,77
A*B*C	1	0,00	0,00	0,00	0,94
Factorial versus Adicionales	1	0,12	0,12	12,40	0,005
Ad1 versus Ad2 Ad3	1	0,01	0,01	0,90	0,36
Ad2 versus Ad3	1	0,00	0,00	0,06	0,80
Repetición	1	0,02	0,02	2,03	0,18
Error Experimental	10	0,10	0,01		

En cuanto al peso seco de las plantas de fréjol, los tratamientos del factorial presentaron mayores pesos que los tratamientos adicionales: testigo con agua destilada, *Rhizobium* y el fertilizante químico (Figura 3.8).

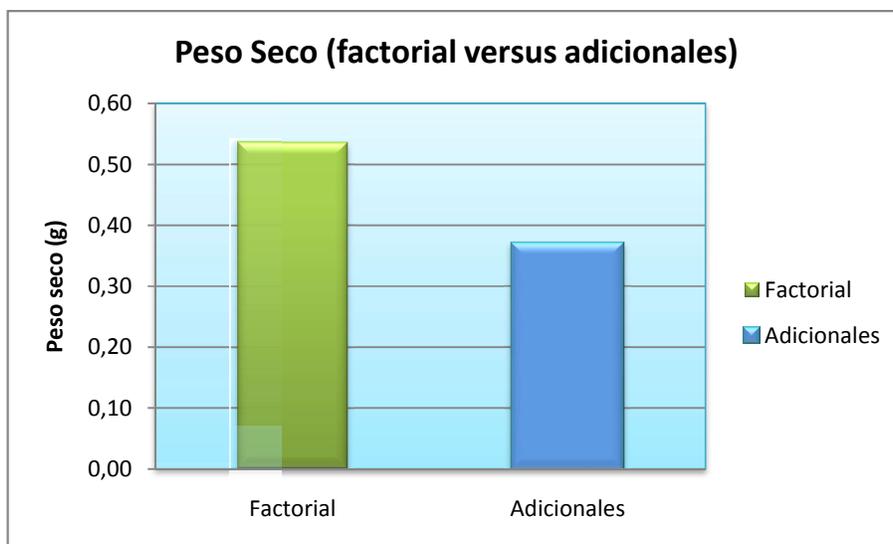
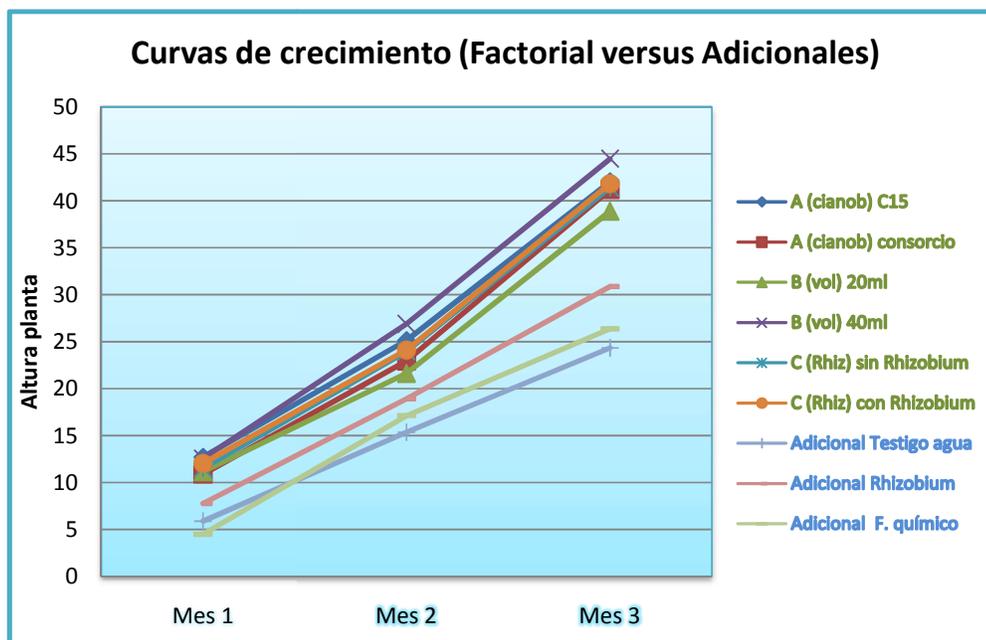


Figura 3.8. Promedios de peso seco de las plantas de fréjol del factorial versus los adicionales, del primer cultivo (Cruz, 2009).

La humedad relativa promedio del primer cultivo de fréjol fue de 90,72%

3.2.4 Crecimiento de las plantas de fréjol.

Las curvas de los factores poseen aproximadamente la misma tendencia de crecimiento de las plantas de fréjol durante los tres meses, en relación a la altura de la planta. La diferencia se aprecia entre el crecimiento de las plantas tratadas con los adicionales cuyas alturas son menores en comparación con las plantas dentro del factorial. El tratamiento con menor crecimiento fue el testigo con agua destilada (Figura 3.9).



Factorial: verde

Adicionales: azul

Figura 3.9. Curvas de crecimiento de las plantas de fréjol (factores versus los adicionales), durante los tres meses de duración de la investigación del primer cultivo (Cruz, 2009).

El crecimiento de las plantas de fréjol del primer cultivo, se puede apreciar mediante las curvas de crecimiento de la figura 3.9 y con ayuda de las fotos de las plantas del Anexo B.

3.3 Segundo Cultivo de Fréjol

3.3.1 Medición de altura de las plantas de fréjol.

Análisis estadístico de los datos de la medición de altura de las plantas de fréjol en el mes 1 del segundo cultivo.

En el primer mes de desarrollo de las plantas de fréjol, para la variable altura de planta, al analizar el volumen de cianobacterias, cultivo de cianobacterias y *Rhizobium* no se halló significación estadística para las fuentes de variabilidad investigadas, con excepción del factorial versus los adicionales que fue significativo (Tabla 3.11).

Tabla 3.11. Análisis de varianza para la altura, del mes 1 del segundo cultivo.

Fuente de Variabilidad	G.L	Suma de Cuadrados	Cuadrado de la Media	F-Valor	Pr > F
Total	32	377,08			
Tratamientos	10	162,03	16,20	2,04	0,08
A (cultivos cianobacterias)	1	3,23	3,23	0,36	0,56
B (volumen cianobacterias)	1	22,49	22,49	2,52	0,13
A*B	1	3,40	3,40	0,38	0,54
C (con o sin <i>Rhizobium</i>)	1	16,95	16,95	1,90	0,18
A*C	1	6,93	6,93	0,78	0,39
B*C	1	22,55	22,55	2,53	0,13
A*B*C	1	0,46	0,46	0,05	0,82
Factorial versus Adicionales	1	64,10	64,10	8,06	0,01
Ad1 versus Ad2 Ad3	1	20,53	20,53	2,58	0,12
Ad2 versus Ad3	1	12,21	12,21	1,54	0,23
Bloques	2	55,96	27,97	3,52	0,05
Error Experimental	20	159,08	7,95		

Análisis estadístico de los datos de la medición de altura de las plantas de fréjol en el mes 2 del segundo cultivo.

En el segundo mes de desarrollo de las plantas de fréjol, se puede notar que para la variable altura de planta, no existió significación estadística para la mayoría de las fuentes de variabilidad investigadas, excepto para el factorial versus los adicionales y el factor C (presencia o ausencia de *Rhizobium*) que fueron significativos (Tabla 3.12).

Tabla 3.12. Análisis de varianza para la altura, para el mes 2 del segundo cultivo.

Fuente de Variabilidad	G.L	Suma de Cuadrados	Cuadrado de la Media	F-Valor	Pr > F
Total	32	2078,28			
Tratamientos	10	965,89	96,59	2,70	0,02
A (cultivos cianobacterias)	1	40,26	40,26	0,69	0,42
B (volumen cianobacterias)	1	192,57	192,5	3,28	0,08
A*B	1	8,62	8,62	0,15	0,71
C (con o sin <i>Rhizobium</i>)	1	298,80	298,8	5,09	0,03
A*C	1	15,60	15,60	0,27	0,61
B*C	1	40,86	40,86	0,70	0,42
A*B*C	1	16,86	16,86	0,29	0,59
Factorial versus Adicionales	1	221,63	221,6	6,19	0,02
Ad1 versus Ad2 Ad3	1	88,55	88,55	2,47	0,13
Ad2 versus Ad3	1	92,38	92,38	2,58	0,12
Bloques	2	396,63	198,3	5,54	0,01
Error Experimental	20	715,75	35,78		

En la prueba de Tukey (Tabla 3.13), para el factor C (presencia o ausencia de *Rhizobium*) se encontraron dos rangos, con la presencia de *Rhizobium* tiene el mejor promedio ya que se ubica en el primer rango.

Tabla 3.13. Prueba de Tukey para la variable altura del factor C (presencia o ausencia de *Rhizobium*), durante el mes 2 del segundo cultivo de fréjol.

Niveles factor C (presencia y ausencia <i>Rhizobium</i>)		Media	Rango de significancia	
c ₂	Presencia de <i>Rhizobium</i>	30,95	a	
c ₁	Ausencia de <i>Rhizobium</i>	23,89		b

Análisis estadístico de los datos de la medición de altura de las plantas de fréjol en el mes 3 del segundo cultivo.

En el tercer mes de desarrollo de las plantas de fréjol, se identifica que para la variable altura de planta se encuentra significación estadística para el factores B (volumen de cianobacterias), el factor C (presencia o ausencia de *Rhizobium*) y el factorial versus los adicionales (Tabla 3.14).

Tabla 3.14. Análisis de varianza para la variable altura, para el mes 3 del segundo cultivo de fréjol.

Fuente de Variabilidad	G.L	Suma de Cuadrados	Cuadrado de la Media	F-Valor	Pr > F
Total	32	2253,60			
Tratamientos	10	1575,40	157,54	5,73	0,00
A (cultivos cianobacterias)	1	17,39	17,39	0,48	0,49
B (volumen cianobacterias)	1	217,40	217,40	6,05	0,02
A*B	1	4,68	4,68	0,13	0,72
C (con o sin <i>Rhizobium</i>)	1	353,40	353,43	9,83	0,006
A*C	1	9,46	9,46	0,26	0,62
B*C	1	314,80	314,89	8,76	0,01
A*B*C	1	17,62	17,62	0,49	0,49
Factorial versus Adicionales	1	574,60	574,63	20,89	0,0001
Ad1 versus Ad2 Ad3	1	69,44	69,44	2,52	0,13
Ad2 versus Ad3	1	60,38	60,38	2,20	0,15
Bloques	2	128,00	64,04	2,33	0,12
Error Experimental	20	550,10	27,51		

Al realizar la prueba de Tukey (Tabla 3.15), para el factor B (volumen de cianobacterias) se encontraron dos rangos, donde el volumen de 40 mL tiene el mejor promedio y se ubica en el primer rango.

Tabla 3.15. Prueba de Tukey para la variable altura; para el factor B (volumen), durante el mes 3 para el segundo cultivo de fréjol.

Niveles factor B (volumen cianobacterias)		Media	Rango de significancia	
b ₂	40 mL	50,43	a	
b ₁	20 mL	44,41		b

En la prueba de Tukey (Tabla 3.16), para el factor C (presencia o ausencia de *Rhizobium*) se identificaron dos rangos, con la presencia de *Rhizobium* tiene el mejor promedio ya que se ubica en el primer rango.

Tabla 3.16. Prueba de Tukey para la variable altura; para el factor C (presencia o ausencia de *Rhizobium*), durante el mes 3 para el segundo cultivo de fréjol.

Niveles factor C (presencia o ausencia de <i>Rhizobium</i>)		Media	Rango de significancia	
c ₂	Presencia de <i>Rhizobium</i>	51,26	a	
c ₁	Ausencia de <i>Rhizobium</i>	43,58		b

Análisis estadístico total de los datos de la medición de altura de las plantas de fréjol del segundo cultivo.

En el análisis de varianza total del desarrollo de las plantas de fréjol del primer cultivo, se observa que para la variable altura de planta no hubo significación estadística para las fuentes de variabilidad investigadas, exceptuado para el factorial versus los adicionales que fue significativo (Tabla 3.17).

Tabla 3.17. Análisis de varianza total para la variable altura de planta del segundo cultivo.

Fuente de Variabilidad	G.L	Suma de Cuadrados	Cuadrado de la Media	F-Valor	Pr > F
Total	98	21177,30			
Tratamientos	10	2201,52	220,15	1,02	0,43
A (cultivos cianobacterias)	1	25,34	25,34	0,11	0,74
B (volumen cianobacterias)	1	371,05	371,05	1,56	0,21
A*B	1	3,53	3,53	0,01	0,90
C (con o sin <i>Rhizobium</i>)	1	538,74	538,74	2,26	0,13
A*C	1	31,09	31,09	0,13	0,71
B*C	1	278,15	278,15	1,17	0,28
A*B*C	1	26,90	26,90	0,11	0,73
Factorial versus. adicionales	1	732,11	732,11	3,45	0,05
Ad1 versus. Ad2 Ad3	1	165,37	165,37	0,76	0,38
Ad2 versus. Ad3	1	145,27	145,27	0,67	0,41
Bloques	2	369,44	184,72	0,85	0,43
Error Experimental	86	18606,30	216,35		

El factorial, es decir, la combinación de los tres factores, A (cianobacterias: C15 o consorcio), B (volumen de cianobacterias: 40 mL o 20 mL) y C (presencia o ausencia de *Rhizobium*), versus los adicionales, presentaron alta significancia durante el periodo de desarrollo del segundo cultivo de fréjol. El factorial tuvo mejores promedios de altura de las plantas que los tratamientos adicionales (Figura 3.10).

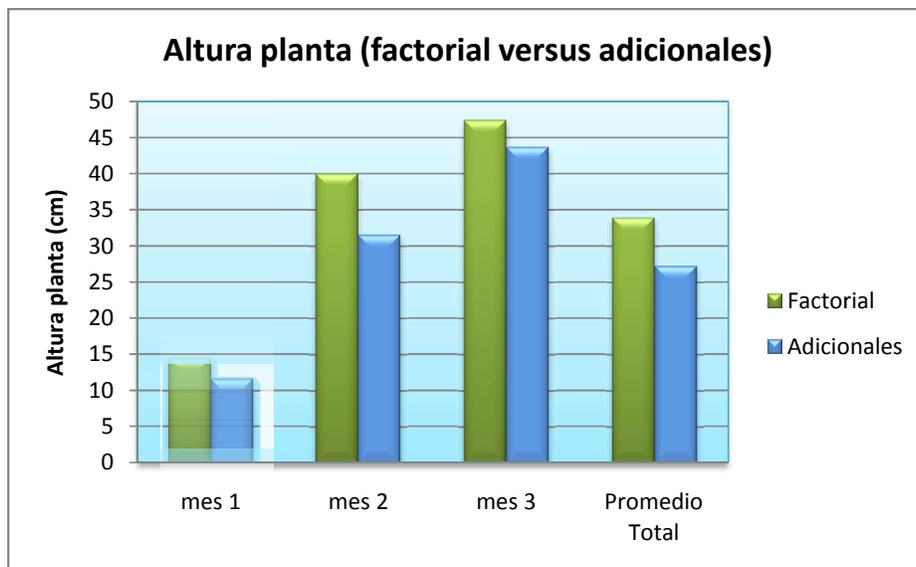


Figura 3.10. Promedios de altura de las plantas de fréjol del factorial versus los adicionales, para cada mes del segundo cultivo (Cruz, 2009).

3.3.2 Medición del área foliar de las plantas de fréjol.

Para la variable área foliar, el factorial versus los adicionales, el factor B (volumen de cianobacterias), el factor C (presencia o ausencia de *Rhizobium*) y los adicionales entre sí fueron significativos (Tabla 3.18).

Tabla 3.18. Análisis de varianza la variable área foliar del segundo cultivo de fréjol.

Fuente de Variabilidad	G.L	Suma de Cuadrados	Cuadrado de la Media	F-Valor	Pr > F
Total	32	1224,88			
Tratamientos	10	896,56	89,65	8,30	<,0001
A (cultivos cianobacterias)	1	27,09	27,09	1,69	0,21
B (volumen cianobacterias)	1	398,81	398,81	24,87	<,0001
A*B	1	0,51	0,51	0,03	0,86
C (con o sin <i>Rhizobium</i>)	1	96,67	96,67	6,03	0,026
A*C	1	5,19	5,19	0,32	0,58
B*C	1	76,44	76,44	4,77	0,044
A*B*C	1	22,36	22,36	1,39	0,25
Factorial versus Adicionales	1	159,91	159,91	14,80	0,001
Ad1 versus Ad2 Ad3	1	123,59	123,59	11,44	0,003
Ad2 versus Ad3	1	14,83	14,83	1,37	0,25
Bloques	2	112,21	56,11	5,19	0,015
Error Experimental	20	216,11	10,80		

Los tratamientos del factorial tuvieron mejores promedios en relación al área foliar de las plantas que los tratamientos adicionales: testigo con agua destilada, *Rhizobium* y el fertilizante químico (Figura 3.11).

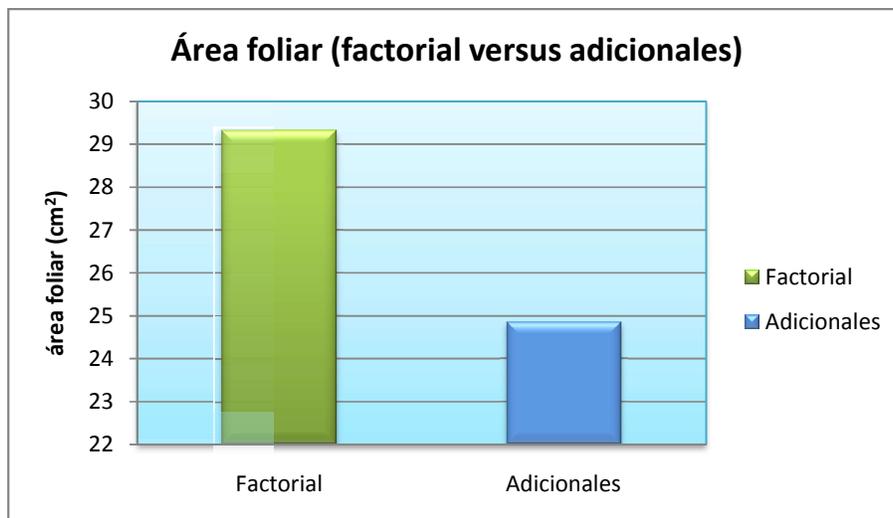


Figura 3.11. Promedios de área foliar de las plantas de fréjol del factorial versus los adicionales del segundo cultivo (Cruz, 2009).

Al realizar la prueba de Tukey (Tabla 3.19), para el factor B (volumen de cianobacterias) se hallaron dos rangos, donde el volumen de 40 mL tiene el mejor promedio y se sitúa en el primer rango.

Tabla 3.19. Prueba de Tukey para la variable área foliar, para el factor B (volumen de cianobacterias) del segundo cultivo de fréjol.

Niveles del Factor B (volumen cianobacterias)		Media	Rango de significancia	
b ₂	40 mL	33,40	a	
b ₁	20 mL	25,25		b

En realizar la prueba de Tukey (Tabla 3.20), para el factor C (presencia o ausencia de *Rhizobium*) se identificaron dos rangos, con la presencia de *Rhizobium* tiene el mejor promedio ya que se ubica en el primer rango.

Tabla 3.20. Prueba de Tukey para la variable área foliar, para el Factor C (presencia o ausencia *Rhizobium*) del segundo cultivo de fréjol.

Niveles del Factor C (presencia o ausencia <i>Rhizobium</i>)		Media	Rango de significancia	
c ₂	Presencia de <i>Rhizobium</i>	31,33	a	
c ₁	Ausencia de <i>Rhizobium</i>	27,32		b

3.3.3 Peso húmedo, peso seco y humedad relativa.

Se observa que para la variable peso húmedo, el factorial versus los adicionales y el factor C (presencia o ausencia de *Rhizobium*) fueron altamente significativos, mientras que el factor A (cultivos cianobacterias) y los adicionales entre sí fueron significativos (Tabla 3.21).

Tabla 3.21. Análisis de varianza para la variable peso húmedo para el segundo cultivo.

Fuente de Variabilidad	G.L	Suma de Cuadrados	Cuadrado de la Media	F-Valor	P > F
Total	21	30,31			
Tratamientos	10	30,09	3,01	147,10	<,0001
A (cultivos cianobacterias)	1	0,13	0,13	9,74	0,014
B (volumen cianobacterias)	1	0,02	0,02	1,52	0,250
A*B	1	0,96	0,96	74,58	<,0001
C (con o sin <i>Rhizobium</i>)	1	16,57	16,57	1278,20	<,0001
A*C	1	0,47	0,47	36,76	0,0003
B*C	1	0,14	0,14	11,11	0,0100
A*B*C	1	0,12	0,12	9,69	0,0140
Factorial versus Adicionales	1	9,42	9,42	460,80	<,0001
Ad1 versus Ad2 Ad3	1	0,18	0,18	9,07	0,0130
Ad2 versus Ad3	1	0,85	0,85	41,92	<,0001
Repetición	1	0,01	0,01	0,45	0,5200
Error Experimental	10				

Para el peso húmedo los tratamientos del factorial presentaron mejores promedios en comparación con los tratamientos adicionales: testigo con agua destilada, *Rhizobium* y el fertilizante químico (Figura 3.12).

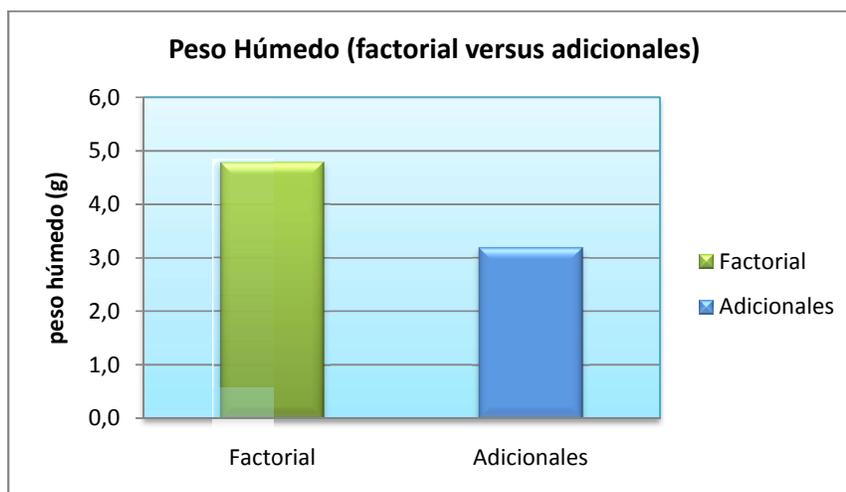


Figura 3.12. Promedios de peso húmedo de las plantas de fréjol del factorial versus los adicionales del segundo cultivo (Cruz, 2009).

En la prueba de Tukey (Tabla 3.22), para el factor A (cultivo de cianobacterias) se observaron dos rangos, donde el consorcio tiene el mejor promedio y se ubica en el primer rango.

Tabla 3.22. Prueba de Tukey para la variable peso húmedo, para el factor A (cultivo de cianobacterias) del segundo cultivo de fréjol.

Niveles Factor A (cultivo cianobacterias)		Media	Rango de significancia	
a ₂	Consorcio	4,87	a	
a ₁	C15	4,69		b

Al realizar la prueba de Tukey (Tabla 3.23), para el factor C (presencia o ausencia de *Rhizobium*) se identificaron dos rangos, con *Rhizobium* tiene el mejor promedio y se encuentra en el primer rango.

Tabla 3.23. Prueba de Tukey para la variable peso húmedo para el Factor C (presencia o ausencia de *Rhizobium*) del segundo cultivo de fréjol.

Niveles Factor C (presencia o ausencia de <i>Rhizobium</i>)		Media	Rango de significancia	
c ₂	Presencia de <i>Rhizobium</i>	5,80	a	
c ₁	Ausencia de <i>Rhizobium</i>	3,76		b

Se identificó que para la variable peso seco, el factor A (cultivo de cianobacterias) fue altamente significativo, mientras que el factorial versus los adicionales, el factor B (volumen de cianobacterias) y los adicionales entre sí fueron significativos (Tabla 3.24).

Tabla 3.24. Análisis de varianza para la variable peso seco, para el segundo cultivo.

Fuente de Variabilidad	G.L	Suma de Cuadrados	Cuadrado de la Media	F-Valor	P > F
Total	21	0,29			
Tratamientos	10	0,28	0,02	22,35	<,0001
A (cultivos cianobacterias)	1	0,08	0,08	90,96	<,0001
B (volumen cianobacterias)	1	0,02	0,02	18,66	0,003
A*B	1	0,10	0,10	119,99	<,0001
C (con o sin <i>Rhizobium</i>)	1	0,00	0,00	3,48	0,09
A*C	1	0,00	0,00	0,48	0,51
B*C	1	0,02	0,02	27,95	0,0007
A*B*C	1	0,03	0,03	39,12	0,0002
Factorial versus Adicionales	1	0,02	0,02	14,28	0,003
Ad1 versus Ad2 Ad3	1	0,01	0,01	6,67	0,03
Ad2 versus Ad3	1	0,01	0,01	6,56	0,03
Repetición	1	0,00	0,00	0,81	0,39
Error Experimental	10	0,01	0,00		

En cuanto al peso seco los tratamientos del factorial mostraron mejores promedios en relación a los tratamientos adicionales: testigo con agua destilada, *Rhizobium* y el fertilizante químico (Figura 3.13).

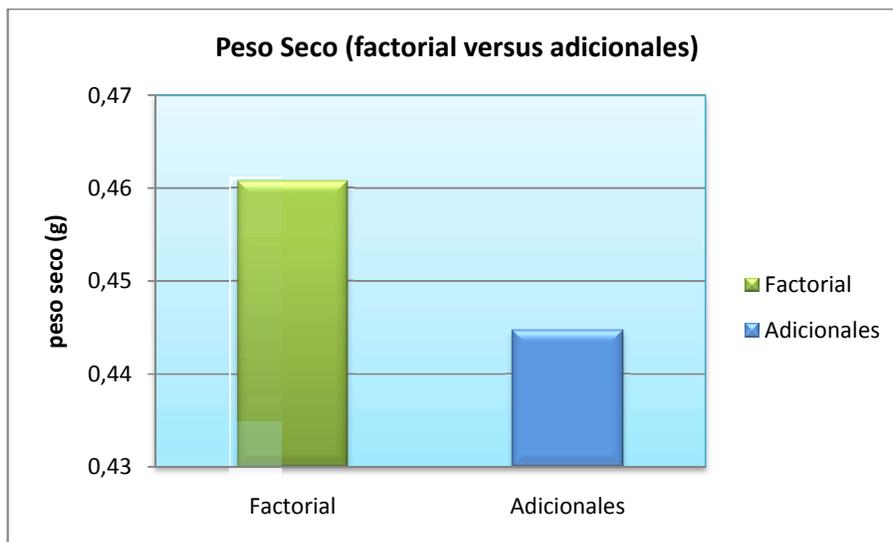


Figura 3.13. Promedios de peso seco de las plantas de fréjol del factorial versus los adicionales del segundo cultivo (Cruz, 2009).

En la prueba de Tukey (Tabla 3.25), para el factor A (cultivo de cianobacterias) se encontraron dos rangos, donde C15 tiene el mejor promedio y se sitúa en el primer rango.

Tabla 3.25. Prueba de Tukey para la variable peso seco, para el factor A (cultivo de cianobacterias) del segundo cultivo de fréjol.

Niveles del Factor A (cultivo cianobacterias)		Media	Rango de significancia	
a ₁	C15	0,49	a	
a ₂	Consortio	0,35		b

Al realizar la prueba de Tukey (Tabla 3.26), para el factor B (volumen de cianobacterias) se hallaron dos rangos, donde el volumen de 40 mL tiene el mejor promedio y se ubica en el primer rango.

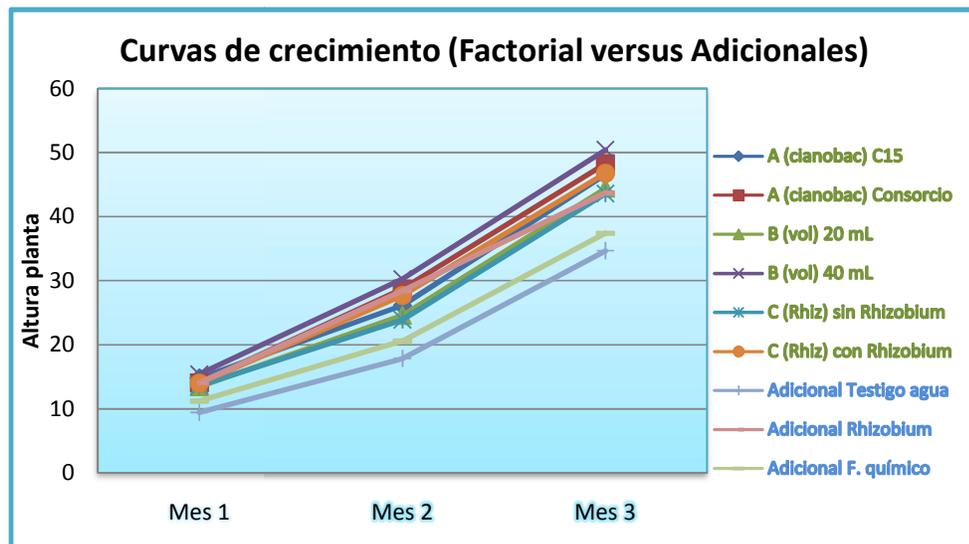
Tabla 3.26. Prueba de Tukey para la variable peso seco, del factor B (volumen de cianobacterias) del segundo cultivo de fréjol.

Niveles del Factor B (volumen cianobacterias)		Media	Rango de significancia	
b ₂	40 mL	0,45	a	
b ₁	20 mL	0,39		b

La humedad relativa promedio del segundo cultivo de fréjol fue de 89%

3.3.4 Crecimiento de las plantas de fréjol.

Las curvas de crecimiento de las plantas de fréjol poseen la misma tendencia de crecimiento durante los tres meses, en relación a la altura de planta. Existe diferencia entre el crecimiento de las plantas tratadas con los adicionales, testigo con agua destilada y el fertilizante químico, cuyas alturas son menores que las de las plantas dentro del factorial (Figura 3.14).



Factorial: verde

Adicionales: azul

Figura 3.14. Curvas de crecimiento de las plantas de fréjol (factores versus los adicionales), durante los tres meses de duración de la investigación del segundo cultivo (Cruz, 2009).

El crecimiento de las plantas de fréjol en el segundo cultivo, se puede observar mediante las curvas de crecimiento de la Figura 3.14 y con ayuda las fotos del Anexo C.

3.4 Costos de los reactivos de la fertilización química con nitrógeno en comparación con la fertilización con cianobacterias fijadoras de nitrógeno.

En la Tabla 3.27 se observan los costos de los reactivos utilizados para el cultivo de cianobacterias a nivel de laboratorio. El costo total para producir 10 litros de biomasa de cianobacterias aplicadas durante seis meses a 24 macetas, con tres plantas de fréjol cada una, fue de ¢0.13 centavos de dólar americano. Si producir un litro de biomasa cuesta ¢0,013 centavos de dólar americano, producir 20 mL de biomasa para la aplicación de una maceta cuesta ¢0,00026 centavos de dólar americano y producir 40 mL de biomasa para la aplicación de una maceta cuesta ¢0,00052 centavos de dólar americano.

Tabla 3.27. Costos de los reactivos para producir 10 litros de biomasa de cianobacterias a nivel de laboratorio.

REACTIVOS	Precio(\$)	gramos / Frasco	gramos /L	Precio /litro	Precio / 10 litros
K ₂ HPO ₄ .3H ₂ O (Fosfato bipotásico)	18,50	125	0,04000	0,00592	0,0592
MgSO ₄ .7H ₂ O (Sulfato de magnesio.)	31,00	500	0,07500	0,00465	0,0465
C6H8O7 (Ácido cítrico)	23,85	500	0,00600	0,00029	0,0029
Fe(NH ₄)HC6H5O7 (Citrato de amonio férrico)	27,10	500	0,00600	0,00033	0,0033
EDTA-Na ₂ (EDTA disodico)	24,10	125	0,00100	0,00019	0,0019
CaCl ₂ .2H ₂ O (Cloruro de calcio.dihidrado)	20,70	500	0,03600	0,00149	0,0149
H ₃ BO ₃ (Ácido bórico)	23,85	500	0,00286	0,00014	0,0014
MnCl ₂ .4H ₂ O(Cloruro de manganeso)	17,35	125	0,00181	0,00025	0,0025
ZnSO ₄ .7H ₂ O (Sulfato de zinc)	11,25	125	0,00022	0,00002	0,0002
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O (Molibdato de sodio)	25	500	0,00039	0,00002	0,0002
CuSO ₄ . 5H ₂ O (Sulfato de cobre)	34	500	0,00008	0,00001	0,0001
Co(NO ₃) ₂ .6H ₂ O (Nitrato de cobalto)	29	125	0,00005	0,00001	0,0001
Total				0,01331	0,1331
Volumen de biomasa de cianobacterias				Costo (¢)	
Aplicación 20 mL				0,00026	
Aplicación 40 mL				0,00052	

En la Tabla 3.28 se observan los costos del reactivo requerido para elaborar la solución química de nitrógeno a nivel de laboratorio. El costo total para producir 10 litros de solución química de nitrógeno aplicada durante seis meses a 6 macetas con 3 plantas de fréjol cada una, fue de ¢0,64 centavos. Si producir un litro de solución química cuesta ¢0,064 centavos de dólar americano, producir 50 mL de solución química para la aplicación de una maceta cuesta ¢0,0032 centavos de dólar americano

Tabla 3.28. Costo del reactivo requerido para la elaboración de una solución química de nitrógeno nivel de laboratorio.

REACTIVOS	Precio(\$)	gramos / Frasco	gramos /L	Precio /litro	Precio / 10 litros
CaNO ₃ (Nitrato de calcio)	35,35	500	0,91	0,064337	0,64337
Total				0,06434	0,6434
Volumen de solución química nitrógeno				Costo (¢)	
Aplicación 50 mL				0,0032	

Se demuestra que el costo de reactivos para producir 10 litros de cianobacterias fue de ¢0,13 centavos de dólar americano; mientras que preparar 10 litros de la solución química de nitrógeno tuvo un costo de ¢0,64 centavos de dólar americano. Se identifica que la fuente química cuesta aproximadamente 5 veces más que la fuente biológica.

CAPÍTULO 4

DISCUSIÓN

4.1 Análisis de sobrevivencia

Para el análisis de sobrevivencia de las cianobacterias en el sustrato y en las hojas se observó crecimiento aproximadamente a los 20 días de haber realizado la inoculación en el medio BG11₀, lo que demuestra que las cianobacterias sobrevivieron con éxito dos semanas después de haber sido aplicadas al sustrato y a las hojas. Según algunos investigadores como Iglesias & Montero (2005) y Fernández (2007) por su gran adaptabilidad a cualquier tipo de ambiente las cianobacterias logran sobrevivir en varios tipos de sustratos.

El análisis de sobrevivencia fue importante para la investigación ya que de este modo se comprobó que las cianobacterias se encontraban en el sustrato y en las hojas, cumpliendo activamente con sus funciones de fijación de nitrógeno y carbono del ambiente, entre otras.

4.2 Primer cultivo de fréjol

Se realizó el cultivo de fréjol durante 90 días, tiempo aproximado de crecimiento de la variedad JE-MA (Murillo et al., 1996), pero al cultivar las plantas de fréjol en cámaras de invernadero, su crecimiento fue más lento y limitado que si hubiera crecido en un invernadero amplio o en el campo, debido al espacio reducido en el que se encontraba la planta, se adaptó y su crecimiento tardó más de lo esperado. Por lo tanto los parámetros que se midieron fueron altura de la planta y área foliar por lo tanto, al no realizarse mediciones tales como número de vainas, o número y peso de granos no fue

necesario esperar a que culmine el desarrollo completo de las plantas (Iglesias y Montero, 2005; Christopher et al., 2007)

4.2.1 Altura de las plantas de fréjol

En cuanto a la variable altura de planta, para el primer cultivo de fréjol hubieron diferencias entre los tratamientos dentro del factorial versus los tratamientos adicionales. Se puede decir que las cianobacterias, C15 y consorcio, en combinación o no con *Rhizobium* produjeron mejores resultados que el testigo con agua destilada, solo *Rhizobium* y el fertilizante químico.

El éxito del factorial sobre los adicionales durante todo el ensayo, se podría atribuir a las cianobacterias, ya que los cultivos empleados fijan carbono y nitrógeno debido a que poseen células vegetativas encargadas de la fotosíntesis (fijación de CO₂) y heterocistos que fijan nitrógeno elemental. Los dos procesos se dan durante el día en presencia de luz natural o en presencia de luz artificial. En la fotosíntesis, las células fijan CO₂ cuya mayor parte es distribuida hacia las células vegetativas y otra parte hacia el sustrato. También durante la fotosíntesis se genera oxígeno, que puede ser aprovechado por la planta para el proceso de respiración celular. El nitrógeno fijado es aprovechado en parte por las cianobacterias, para la formación de aminoácidos y lo demás es depositado en el ambiente en el que se encuentran, siendo utilizado por plantas y microorganismos (Parés & Juárez, 1997; Lerner, 1999). Además, las cianobacterias son capaces de tolerar un amplio rango de condiciones ambientales, incluyendo las extremas, que excluyen a la mayoría de microorganismos. Las cianobacterias pueden ser usadas potencialmente como biofertilizantes en cultivos bajo condiciones extremas (Castelholz, 2000).

Para el mes 1 del primer cultivo, únicamente el factor A (cultivo de cianobacterias) presentó diferencia en el crecimiento de las plantas de fréjol,

esto indica que las plantas bajo los tratamientos con la cepa C15 tuvieron mayor crecimiento que los tratamientos bajo el consorcio, posiblemente debido a que esta cepa se caracteriza por presentar muchos heterocistos (Castro et al., 2002; Iglesias & Montero, 2005; Montaña, 2005). Al ser la cepa C15 un cultivo puro de cianobacterias, probablemente aportó con mayor fijación de nitrógeno por su gran cantidad de heterocistos comparadas con las del consorcio en donde existían otros tipos de cianobacterias y bacterias.

Como se mencionó anteriormente, es posible que para este primer mes la tasa de fijación de nitrógeno por parte de la cepa C15 fue mayor que la del consorcio de cianobacterias, que necesitó de más tiempo para adaptarse al sustrato y que sus cianobacterias y bacterias pueden ser capaces de fijar nitrógeno en una cantidad similar a la del cultivo puro, ya que en los siguientes meses no existió diferencia entre los tratamientos con cianobacterias, esto quiere decir, que el consorcio y C15 promovieron el crecimiento de las plantas de fréjol de igual forma en los meses 2 y 3 del primer cultivo.

Para el mes 2 del primer cultivo solamente el factor B (volumen de cianobacterias) presentó diferencia. Resultó mejor aplicar 40 mL que aplicar 20 mL, debido a que en los 40 mL se encontraban mayor número de células para la fijación de nitrógeno y carbono. Una de las razones por las que en este mes fue mejor aplicar 40 mL fue que la biomasa obtenida a nivel de laboratorio posee los nutrientes necesarios, en el medio de cultivo en el que creció, en este caso específico BG11_o, pero cuando se la aplica a un sustrato nuevo para las células, estas atraviesan un periodo de adaptación, es decir, solo sobreviven las más aptas y fuertes, para posteriormente colonizar este nuevo sustrato (Garbisu et al., 1999). En el mes 1 no se observó diferencia para este factor ya que fue el periodo de adaptación para la cianobacterias, además que el crecimiento durante la primera etapa de desarrollo de las plantas de fréjol, suele ser uniforme (Murillo et al., 1996). De igual manera ocurrió en el mes 3, en el que no se encontró diferencia para la aplicación de los dos volúmenes de cianobacterias, debido a que posiblemente además de las aplicaciones

realizadas cada dos semanas a los cultivos de fréjol, también hubo crecimiento celular a nivel del sustrato ya que las cianobacterias se encontraban completamente adaptadas (Garbisu et al., 1999).

La inoculación de cianobacterias vivas fijadoras de nitrógeno no simbióticas al suelo, se conoce como *algalización* y ha presentado buenos resultados en cultivos anegados como el arroz y cultivos secos como la soya (García, 2005; Iglesias & Montero, 2005).

El nitrógeno es un factor limitante en el crecimiento de las plantas y debe ser aplicado en la medida justa, ya que en una cantidad muy baja no aporta al crecimiento de la planta y en muy alta concentración puede inhibir su crecimiento (García, 2005; Iglesias & Montero, 2005). Iglesias & Montero, 2005 en su trabajo aplican un volumen de 50 mL de una concentración desconocida de cianobacterias. Al no contar con un referente específico que indique la concentración de células y volúmenes adecuados debidamente investigados de estas cepas de cianobacterias, en este trabajo se implementó un ensayo previo a su realización, aplicando varios volúmenes de cianobacterias (10 mL, 30 mL, 50 mL) en una concentración de $6,9 \times 10^7$ células/mL a las plantas de fréjol. El volumen de 30 mL presentó los mejores resultados, por lo que se decidió utilizar 20 mL y 40 mL para el diseño experimental de la tesis.

La concentración celular de las cianobacterias fue escogida mediante una curva de crecimiento realizada en el ensayo previo, $6,9 \times 10^7$ células/mL correspondió a la fase exponencial y por lo tanto las células se encontraban en su etapa metabólica óptima.

En los resultados obtenidos por Iglesias & Montero (2005) y Sotelo et al., (2006), se observa que las plantas en los tratamientos con cianobacterias presentaron alturas mayores que las plantas en los tratamientos control. Cabe

recalcar que estos trabajos fueron realizados con otras especies de plantas y en diferentes condiciones; sin embargo, son investigaciones que demuestran que las cianobacterias son estudiadas a nivel mundial para la preparación de biofertilizantes.

Por otro lado, se explica los resultados obtenidos con *Rhizobium* en el primer cultivo de fréjol. Posiblemente se deben a que la respuesta inmediata, según Díaz (2008) a la inoculación del suelo con *Rhizobium* varía considerablemente dependiendo de la densidad del inoculante y de las condiciones ambientales. Para que *Rhizobium* pueda fijar nitrógeno es necesario que forme nódulos en las raíces de la planta huésped. Al ser inoculado en el sustrato, *Rhizobium* requiere de un periodo de adaptación lo que pudo representar un limitante en este cultivo.

Sin embargo *Rhizobium* puede estimular la germinación de las semillas y promover el crecimiento de las plantas debido a su habilidad para producir hormonas como el ácido indol acético, ácido giberélico y citoquininas, sustancias reguladoras del crecimiento vegetal (Santillana et al., 2005;).

4.2.2 Área foliar de las plantas de fréjol.

Para el primer cultivo de fréjol, en cuanto al área foliar de las plantas hubieron diferencias entre los tratamientos del diseño factorial y los adicionales y el factor B (volumen de cianobacterias). En cuanto a este último, las plantas a las que se les aplicaron 40 mL de cianobacterias tuvieron mayores áreas foliares que aquellas plantas a las que se les aplicaron 20 mL. Al inocular 40 mL hay mayor cantidad de células de cianobacterias que aportaron con la fijación de nitrógeno y carbono. Posiblemente también las cianobacterias aportaron en la protección de las hojas contra patógenos y con la retención de agua (Franco, 2004; Lerner, 1999; Parés & Juárez, 1997).

4.2.3 Peso húmedo, seco y humedad relativa.

Para el primer cultivo de fréjol los mayores pesos húmedos y secos se dieron en las plantas bajo los tratamientos del diseño factorial: cultivo de cianobacterias, volumen de cianobacterias y ausencia o presencia de *Rhizobium* y esto probablemente se debe a que además del aporte de nitrógeno y carbono, las cianobacterias favorecen la retención de la humedad y representan una fuente de materia orgánica cuando cumplen su ciclo vital (Iglesias & Monteros, 2005). En las plantas los requerimientos de humedad y agua son muy importantes ya que durante la fotosíntesis se usa el agua como agente reductor, de igual forma ocurre con las cianobacterias. Posiblemente las cianobacterias ayudan al equilibrio hídrico disminuyendo las pérdidas de agua, regulando la temperatura además de la fijación de nitrógeno y carbono (Castro et al., 2002; Lerner, 1999). Las cianobacterias al mantener la humedad en el sustrato por más tiempo ayudan a que las plantas se encuentren hidratadas y por dicha razón los tratamientos con cianobacterias son los que presentaron mayores pesos húmedos.

4.3 Segundo cultivo de fréjol

4.3.1 Altura de las plantas de fréjol

Durante el desarrollo del segundo cultivo de fréjol para medición de la altura de las plantas, se observó diferencia estadística entre el factorial y los adicionales, apreciándose una mayor altura para los tratamientos dentro del factorial, demostrando que fue mejor aplicar cianobacterias que los tratamientos sin cianobacterias durante los tres meses que duró el ensayo.

Para los meses 2 y 3 del segundo cultivo, el factor C que es la aplicación o no de *Rhizobium*, fue significativo, por lo tanto los tratamientos con *Rhizobium* fueron mejores que aquellos donde no se aplicó. Según la teoría de Díaz (2008), el éxito de la aplicación de *Rhizobium* depende de muchos factores y, al parecer, el método de inoculación de las semillas es más efectivo

comparándolo con el método de aplicación al sustrato. En el mes 1 no se observó diferencia para el factor C, ya que en este tiempo posiblemente se encontraban adaptándose al sustrato y a las condiciones de las cámaras de invernadero.

En el mes 3 del segundo cultivo en referencia al factor B (volumen de cianobacterias) aplicar 40 mL presentó mayores alturas de las plantas de fréjol que aplicar 20 mL, al igual que en el mes 2 del primer cultivo.

4.3.2 Área foliar de las plantas de fréjol.

Para el segundo cultivo de fréjol, en cuanto al área foliar de las plantas, los tratamientos del factorial fueron mejores que los adicionales, debido a la presencia de cianobacterias las que promovieron un mayor crecimiento de las hojas de las plantas de fréjol, puesto que actuaron como biofertilizantes proporcionando a la planta de nutrientes como el nitrógeno y el carbono como ya se ha analizado anteriormente (Parés & Juárez, 1997; Lerner, 1999). Dentro de los tratamientos adicionales, el testigo formado solamente por agua destilada fue el más bajo de todos, dándole seguridad a los resultados del trabajo.

En el segundo cultivo de fréjol, al emplear 40 mL de cianobacterias provocó mejor efecto sobre el área foliar debido a que mientras mayor número de células por mililitro mayor capacidad de fijación de nitrógeno y carbono, permitiéndoles crecer más que las plantas en las que se aplicaron 20 mL. Según Christopher et al. (2007) la aplicación foliar de cianobacterias resulta benéfica para el crecimiento del área y para aumentar el número de hojas.

Los tratamientos con la aplicación de *Rhizobium* en combinación con la cianobacterias presentaron mejores resultados de crecimiento de las áreas

foliares en esta investigación, beneficiando en conjunto el tamaño de las hojas, al compararlos con el tratamiento de la solución química de nitrógeno, por lo tanto *Rhizobium* promovió el crecimiento de las áreas foliares de las plantas de fréjol tal como lo indican: Estévez (1983), López (2000), Santillana (2006) y Wang & Martínez (2004), en combinación con las cianobacterias C15 y el consorcio.

4.3.3 Peso húmedo, seco y humedad relativa.

Para el segundo cultivo de fréjol, los tratamientos de las plantas del factorial fueron mayores en cuanto a sus pesos húmedos y secos, al igual que en el primer cultivo.

En relación al peso húmedo existió diferencia únicamente en los factores A (cultivo de cianobacterias) y C (presencia o ausencia de *Rhizobium*). Para el factor A, se observó que en el consorcio tuvo un mayor peso húmedo en las plantas de fréjol al finalizar el ensayo, posiblemente debido a que sus células mantienen mejor la humedad que las células del cultivo puro C15. Para el factor C, se encontró que con la presencia de *Rhizobium* tuvo mayor humedad en las plantas de fréjol al terminar la investigación (Díaz, 2008).

En relación al peso de seco se observó que el factor A (cultivo de cianobacterias) presentó diferencia siendo en este caso el cultivo C15 el que tuvo el mayor peso seco, como se mencionó en el primer cultivo las cianobacterias además de aportar con la fijación de nitrógeno y carbono, también representan una fuente de materia orgánica cuando cumplen su ciclo vital, C15 al ser un cultivo puro, sus células aportan nitrógeno al suelo al descomponerse (Iglesias & Monteros, 2005). Para el peso seco el factor B (volumen de cianobacterias) también presentó diferencia, siendo los 40 mL de cianobacterias los que proporcionaron a las plantas un mayor peso seco en

comparación con los pesos secos de las plantas bajo los tratamientos adicionales.

4.4 Costos de los reactivos de la fertilización química con nitrógeno en comparación con la fertilización con cianobacterias fijadoras de nitrógeno.

Analizar los costos sobre el preparado de cianobacterias demuestra que además de ser una alternativa ecológicamente aceptable es económicamente rentable. A nivel de laboratorio se pudo apreciar que los reactivos para la elaboración de 10 litros de cianobacterias fue cinco veces menos costosa que la preparación de la solución química de nitrógeno. El impacto real de la producción de cianobacterias como biofertilizante sería a escala industrial, donde se apreciaría su verdadero valor.

Algunos autores como Hubbell & Kidder (2003) y Ortega et al., (2004) sustentadamente afirman que elaborar fertilizantes nitrogenados industrialmente por procesos químicos son muy costosos por los combustibles fósiles que se emplean. Por otro lado implementar una producción industrial de cianobacterias como biofertilizantes es poco costosa debido a que sus necesidades nutricionales son muy básicas, pueden crecer en agua de vertiente suplementada y los fotobiorreactores son simples y fáciles de construir y producen un impacto ambiental mínimo, sin utilizar fuentes de energía costosas, requieren únicamente de luz, agua y nutrientes básicos (Garbisu et al., 1999).

El nitrógeno gaseoso representa aproximadamente el 80% de la atmósfera terrestre. El nitrógeno es una de las claves globales de la producción agrícola, se estima que de 150 a 200 millones de toneladas de N_2 son requeridas cada año por las plantas dentro de los sistemas agrícolas, para producir el alimento mundial, alimento para animales y productos para la

industria. Para cumplir en parte esta demanda 100 millones de toneladas de nitrógeno son fijadas anualmente vía industrial mediante el proceso de Haber Bosch (Unkovich et al., 2008). El nitrógeno atmosférico es una molécula compuesta por dos átomos, unidos por un triple enlace muy fuerte (Hubbell & Kidder, 2003) por lo que la reducción química de nitrógeno requiere de grandes cantidades de energía para alcanzar las altas temperaturas y presiones que se necesitan en este proceso (Anexo D) las cuales se consiguen empleando inmensas cantidades de combustibles fósiles, que a más de ser costosas al ser quemadas producen gases de efecto invernadero, muy nocivos para el medio ambiente.

La producción de fertilizante nitrogenado alcanza altos costos. Esto se debe a que el costo de los combustibles utilizados en la producción de fertilizantes nitrogenados representa entre el 70 y el 80 % del costo total (Hubbell, 2003; Ortega et al., 2004).

Una alternativa a los fertilizantes nitrogenados son los microorganismos fijadores de nitrógeno. Los microorganismos simbióticos como *Rhizobium* obtienen su energía para la fijación de nitrógeno de la oxidación de los carbohidratos obtenidos de las plantas (Hubbell, 2003). Las cianobacterias captan la energía lumínica a través de ficobilisomas, complejos proteicos exclusivos de estos procariontes, para emplearla en la fijación de nitrógeno atmosférico (Garbisu et al., 1999), razón por la cual se considera que las cianobacterias pueden aportar con nitrógeno al sustrato en el que se encuentran, sin gasto de energía no renovable ya que aprovechan la luz solar para hacerlo. Además de muchos otros beneficios, como la posibilidad de crecer en espacios reducidos, la fijación de CO₂ aportando a la reducción de la contaminación atmosférica y la simpleza de su cultivo en comparación con la infraestructura de los procesos químicos de producción de los fertilizantes nitrogenados, hacen de las cianobacterias una alternativa a ser considerada (Anexo E).

CAPÍTULO 5

CONCLUSIONES

- Los tratamientos con microorganismos (cianobacterias: C15 y consorcio y *Rhizobium*) promovieron el crecimiento de las plantas de frejol mostrando diferencia estadística sobre la fertilización química nitrogenada.
- Los tratamientos con microorganismos resultaron estadísticamente dentro del mismo grupo, el que demostró diferencia altamente significativa en relación al fertilizante químico nitrogenado.
- La aplicación de 40 mL de cianobacterias mostró diferencia estadística con la de 20 mL presentando mayor altura y área foliar de las plantas de fréjol en los dos cultivos.
- El costo de los reactivos para la producción de biomasa de cianobacterias fue cinco veces menor que el costo para la preparación de la solución química de nitrógeno a nivel de laboratorio.

CAPÍTULO 6

RECOMENDACIONES

1. Probar con otras concentraciones o volúmenes de cianobacterias distintos a los probados en esta investigación, tanto del consorcio como de la cepa C15, y evaluar sus efectos sobre las plantas de fréjol.
2. Aislar cianobacterias de cultivos orgánicos específicos y analizar su utilidad en la biofertilización.
3. Evaluar la capacidad fertilizante de las cianobacterias sobre sustrato sin esterilizar.
4. Realizar un diseño experimental donde un tratamiento sea la aplicación de cianobacterias únicamente a las hojas y otro tratamiento la aplicación de cianobacterias solo al sustrato.

CAPÍTULO 7

BIBLIOGRAFÍA

- Admin, A. (2009) Cultivo de microalgas. Extraído el 7 de septiembre, 2009, de www.renovables-energia.com/wpcontent/uploads.
- Biodiversity of microorganisms and insects for food and agriculture: status and needs. (2007). FAO. Commission on genetic resources for food and agriculture. Rome, pp.11-15 June 2007. Extraído el 29 de mayo, 2009 de <http://ftp.fao.org/ag/cgrfa/cgrfa11/r11w153e.pdf>.
- Brown, A. (2007) Benson's microbiological applications laboratory manual in general microbiology. New York. McGraw Hil. pp. 420.
- Burdass, D. (2002) *Rhizobium*, Root Nodules & Nitrogen Fixation. Society for General Microbiology.
- Castro, R., Novo, R., & Castro, I. (2002). Uso del género *Azolla* como biofertilizante en el cultivo del arroz (*Oryza sativa* L.).
- Castenholz, R. (2000) Phylum BX. Cyanobacteria. Oxygenic Photosynthetic Bacteria. pp. 478-479.
- Christopher, A., Viswajith, V., Prabha, S., Sundhar, K. Malliga, P. (2007) Effect of coir pith based cyanobacterial basal and foliar biofertilizer on *Basella rubra* L. Acta agriculturae Slovenica, 89 - 1, avgust 2007. pp. 60-62.
- Cossoli, M., Iglesias, M., Pérez, G., & Gómez, C. (2008) La biofertilización, su interacción con la presencia de *Rhizobium* y micorrizas en el suelo. Universidad Nacional de Nordeste. Secretaría General de Ciencia y Técnica. Avda. Libertad 5400 - (3400) Corrientes. Argentina. pp. 1.

- Diario el Comercio. (2009) Alimentos orgánicos y sanos. Diario el Comercio, sección Familia. Extraído el 11 de mayo, 2009 de http://www.elcomercio.com/solo_texto_search.asp?id_noticia.
- Díaz, A. (2008) La biofertilización como técnica sostenible. Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología. México, D.F., 06470. pp. 15.
- Esqueda, M., Carillo, R., Sosa, M., Melgoza, A., Royo, M., & Jiménez, J. (2002). Emergencia y sobrevivencia de gramíneas inoculadas con biofertilizantes en condiciones de invernadero. *Tec Pecu Mex* 2002:42(3): pp. 459-475.
- Estévez, C. (1983) Evaluación de cepas de *Rhizobium leguminosarum* (Frank) en el cultivo de arveja. Universidad Central del Ecuador. Facultad de Ciencias Agrícolas. Quito-Ecuador. pp. 7-19; 34-35.
- Fernández, M. (2007) Microalgas del suelo. Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria. Estación Experimental Agropecuaria San Luis. Año 4. Número 14. pp. 2,3.
- Franco (2004). *Azolla-Anabaena* como abono alternativo en la producción de arroz en el litoral ecuatoriano. Escuela Politécnica de Litoral. Guayaquil-Ecuador. pp. 21.
- García, R. (2005). Usos y aplicaciones de macroalgas, microalgas y cianobacterias en agricultura ecológica UIB - Fundación Cátedra Iberoamericana http://www.uib.es/catedra_iberamericana/publicaciones/seae/mesa1/macroalgas.html.
- Garbisu, C., Blanco, A., Alkorta, I., Llama, M., Serra, J. (1999) Biotecnología con cianobacterias. *Investigación y ciencia*. Mayo 1999. pp. 64-71.

- Ghosh, N. (2002) Promoting Bio-fertilizers in Indian Agriculture. Institute of Economic Growth University Enclave. Delhi. India. pp. 2-4.
- Hubbell, D., & Kidder, G. (2003) Biological Nitrogen Fixation. University of Florida. IFAS Extension SL-16. pp.1-4.
- Iglesias, M., & Montero, R. (2005). Inoculación de cianobacterias en el cultivo de soja, efectos sobre la infectividad de *Bradyrhizobium japonicum* y la producción de materia seca. Comunicaciones científicas y tecnológicas 2005. Resumen: A-052 Universidad Nacional del Nordeste. pp. 1-4.
- Jolla, G. (2009) Alga Farm Regents of the University of California San Diego Center for Algae Biotechnology. <http://algae.ucsd.edu/algae-farm.shtml>.
- Kuehl, R. (2001) Diseño de Experimentos. Principios Estadísticos de diseño y análisis de investigación. Editorial Thomson International. México. pp. 89.
- León, C., & Rojas, J. (1996). Utilización de cianobacterias (algas verde-azules) fijadoras de nitrógeno y el helecho acuático azolla, como biofertilizantes en el cultivo de arroz anegado. Extraído el 19 de abril, 2008.
- Lerner, H., Böhme, H., Masepohl, B. (1999) Plant responses to environmental stresses. Differentiation of Vegetative Anabaena Cells into Nitrogen-Fixing Heterocysts. University of Bonn. Alemania. pp. 91-92.
- Leyva, A., Herdández, A., Elein, T. (2005). Microorganismos benéficos como biofertilizantes eficientes para el cultivo de tomate. Rev Colomb. Biotecnol. Vol VII No.2 Diciembre 2005 47-54. Extraído el 8 de junio, 2008 de <http://www.inta.gov.ar/valleinferior/info/documentos/vegetal/organica3.pdf>.
- Lindemann, W., Glover, C. (2008) Nitrogen Fixation by Legumes. Guide A-129. Cooperative Extension Service. College of Agriculture and Home

Economics. New Mexico State University.

- López, I. (2000) *Rhizobium* y su destacada simbiosis con las leguminosas. Centro de Investigación sobre Fijación de Nitrógeno, Universidad Nacional Autónoma de México. pp. 1.
- MAG. (2005). El fréjol en el Ecuador. Ministerio de Agricultura, Ganadería, Acuacultura y Pesca del Ecuador. Extraído el 17 de abril, 2008 de http://www.sica.gov.ec/cadenas/frejol/docs/frej_esp.htm.
- MAG. (2005). Mundo: Principales Productores De Fréjol. Ministerio de Agricultura, Ganadería, Acuacultura y Pesca del Ecuador Extraído el 16 de abril, 2008 de <http://www.sica.gov.ec/cadenas/frejol/docs/Producción%20Mundial.htm>.
- Mark, G., Barea, J., Hass, D., King, D., William, P. (2002) Tendencias actuales en agricultura sostenible. Boletín Técnico N° 1 de ECO-SAFE. Universidad Nacional de Irlanda. pp. 2.
- Medina, N. & León, O. (2004) Biotechnology and sustainable agriculture: biofertilizers and biopesticides. Natural Institute of Agricultural Science. pp. 14-15. Extraído el 29 de mayo, 2009, de http://www.pugwash.org/reports/ees/cuba2004//07_Ondina.pdf.
- Montaña. (2005). Estudio de la aplicación de *Azolla-Anabaena* como bioabono en el cultivo de arroz en el Litoral ecuatoriano. Revista Tecnológica ESPOL, Vol. 18, N. 1, pp. 147-151, (Octubre, 2005), ISSN.
- Moreno, F. (1998) Proceso Haber-Bosch para la obtención de amoníaco. Extraído el 7 de septiembre, 2009, de <http://usuarios.lycos.es/fresenius1/proces03.htm>.

- Morte, A., Guitierrez, A., Dreyer, B., Torrente, P., & Honrubia, M. (2004). Biofertilizantes de última generación. Extraído el 14 de abril, 2008, de http://www.calidadambiental.info/murcia/sec5_libros/pdf/asuncionmorte.pdf.
- Murillo, A., Peralta, E., Pinzón, J., Lépiz, R., Ortega, A. (1996) INIAP - 418 - JE.MA. Variedad mejorada de fréjol arbustivo (*Phaseolus vulgaris* L.) para la cuenca del río Chota. Programa Nacional de Leguminosas. Estación Experimental Santa Catalina. Plegable divulgativo N°160. Quito – Ecuador.
- Ortega, E., Fernández, L., Ortega, P., Rodés, R. (2005) La fijación biológica del nitrógeno en la caña de azúcar. Laboratorio de Fisiología Vegetal, Facultad de Biología, Universidad de la Habana.
- Padhi, S., & Swain, P. (2001). Effective role of microorganism and seaweeds as biofertilizers in organic farming for a sustainable environment. Use of biofertilizers as organic fertilizers. Algal Research Laboratory, Department of Botany Berhampur University. pp. 1-2.
- Parés, R., & Juárez, A. (Eds.). (1997) Bioquímica de los microorganismos. pp. 313-315. Editorial Reverté.
- Pastorelly, D. (2007). Agricultura Orgánica. Extraído el 12 de mayo, 2008, de http://www.sica.gov.ec/agronegocios/biblioteca/ing%20rizzo/perfiles_productos/organico.pdf. pp.2-5.
- Peña, H., & Reyes, I. (2007) Aislamiento y evaluación de bacterias fijadoras de nitrógeno y disolventes de fosfatos en la promoción del crecimiento de la lechuga. Interciencia. Agosto año/col.32, número 008. Asociación Interciencia. Caracas, Venezuela.

- Pérez, M. (2000). CRYSTAL CHEMICAL®. Departamento Técnico de Crystal Chemical Inter-América. Extraído el 19 de abril, 2008. <http://www.crystal-chemical.com/frejol.htm>.
- Quinta, A. (2001) Cultivo de macroalgas, microalgas y cianobacterias. Centro de Biotecnología Marina. Universidad de Las Palmas de Gran Canaria *España*. www.cbm.ulpgc.es/imabangal/raceway.jpg.
- Rippka, R., Waterbury, J., Stanier, R. (1979). Isolation and Purification of Cyanobacteria: Some General Principles. pp 213-219.
- Sanjuán, J., Racca, R., Uribe, D., & Valencia, H. (2006). Producción de Biofertilizantes. Extraído el 14 de abril, 2008 de http://www.unal.edu.co/documentos/seminarioCABBIO_20060531.pdf.
- Santillana, N., Arellano, C., Zúñiga, D. (2005) Capacidad del *Rhizobium* de promover el crecimiento en plantas de tomate (*Lycopersicon esculentum miller*). Ecología Aplicada. Universidad Nacional Agraria La Molina. Lima Perú. pp 47-51.
- Santillana, N. (2006). Producción De Biofertilizantes Utilizando *Pseudomonas sp.* Ecología Aplicada, 5(1,2), Departamento Académico de Biología, Universidad Nacional Agraria La Molina, Lima Perú. Pág. 87-91. Extraído el 17 de abril, 2008 de <http://www.lamolina.edu.pe/ECOLAPL/>.pdf.
- Sotelo, C., Iglesias, M., Carbajal, L., Zago, M (2006). Inoculación y Coinoculación Bradyrhizobium – Cianobacterias en el cultivo de Soja. Comunicaciones científicas y tecnológicas 2006. Resumen: A-039- Universidad Nacional del Nordeste. pp 1-4.
- Suquilanda, M. (1995) Guía para la producción orgánica de cultivos. Sica Proyecto Banco Mundial. Extraído el 8 de junio, 2009, de

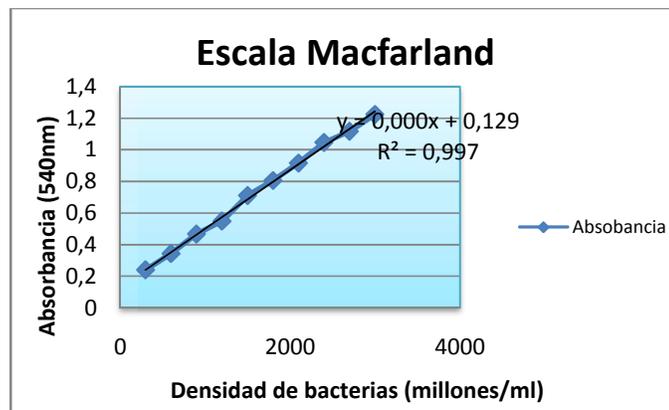
<http://www.sica.gov.ec/agronegocios/productos%20para%20invertir/organicos/conceptos/principios%20agricultura%20organica.htm>.

- Suquilanda, M. (2007). La producción orgánica de cultivos en el Ecuador. Servicio de información y censo agropecuario (SICA), Extraído el 14 de abril, 2008, de http://www.sica.gov.ec/agronegocios/productos/organicos/organicos_ecuador/agricultura_organica.htm.
- Ulloa, D. (1993) Respuesta de Tres Variedades de Fréjol (*Phaseolus vulgaris* L.) a la aplicación de zinc, azufre y *Rhizobium* en Imbabura. Universidad Central del Ecuador. pp. 5-16; 20-28.
- Unkovich, M., Herridge, D., Peoples, M., Cadisch, G., Boddey, B., Giller, K., Alves, B., Chalk, P. (2008) Measuring plant-associated nitrogen fixation in agricultural systems. Australian Centre for International Agricultural Research.
- Wang, T., & Martínez, J (2004) Taxonomía de *Rhizobium*. Departamento de Microbiología, Escuela Nacional de Ciencias Biológicas, Instituto Politécnico Nacional. 2 Centro de Investigación sobre Fijación de Nitrógeno, Universidad Nacional Autónoma de México. Extraído el 13 de mayo, 2008 de http://www.microbiologia.org.mx/microbiosenlinea/CAPITULO_12/.pdf.
- Zaccaro M. (2005). Biofertilizantes cianobacteriales: una estrategia ecológica para mejorar la producción vegetal. Extraído el 15 de abril, 2008 de <http://www.rec.uba.ar/Programacion%2098-00/htm/tx79.htm>.

Anexo A: Obtención de la concentración de *Rhizobium* empleando la escala de McFarland 2.

Tubos	Concentración Millones/mL	Absorbancia (540 nm)
1	300	0,240
2	600	0,343
3	900	0,466
4	1200	0,548
5	1500	0,710
6	1800	0,805
7	2100	0,915
8	2400	1,046
9	2700	1,116
10	3000	1,223

Relación entre la concentración bacteriana (millones/mL) y la absorbancia (540 nm) a escala de McFarland 2 (Brown, 2007).



Escala de McFarland 2 (540 nm). Relación entre concentración bacteriana vs. Absorbancia (Brown, 2007).

Concentración teórica (millones bacterias /ml)	Absorbancia teórica (450nm)	Promedio absorbancias de <i>Rhizobium</i> (540nm)	Concentración <i>Rhizobium</i> (millones bacterias /ml)
600	0,343	0,3505	613,12

Concentración de *Rhizobium* (millones/mL) en medio Levadura Manitol por un período de 7 días a 26°C de incubación. La concentración y absorbancias teóricas son valores establecidos a escala de McFarland 2 (Cruz, 2009).

La concentración de *Rhizobium* aplicada a los tratamientos fue de de $6,13 \cdot 10^8$ bacterias/mL.