

# **Producción a pequeña escala de biofertilizante a base de *Rhizobium*, micorrizas y compost para el crecimiento de frijol en suelos extraídos de zonas de construcción de la Universidad EIA.**

## **Resumen**

En los sistemas agrícolas, el nitrógeno es un nutriente esencial para el adecuado desarrollo de las plantas, siendo absorbido principalmente en forma de nitrato o amonio. Las bacterias del género *Rhizobium* tienen la capacidad de fijar el nitrógeno a través de una simbiosis con las leguminosas como el frijol. En este proyecto se llevó a cabo el aislamiento, identificación y caracterización bioquímica de cepas de *Rhizobium* sacadas de nódulos de las raíces de plantas de maní forrajero para la producción de un biofertilizante a base de *Rhizobium* a pequeña escala, con el fin de evaluar la asociación *Rhizobium*-leguminosa (frijol) en suelos extraídos de zonas de construcción y comparar los resultados con un control y un fertilizante químico. Los resultados obtenidos mostraron que los indicadores a los que se les aplicó el tratamiento con *Rhizobium* mostraron un mejor crecimiento en las principales partes de las plantas (tallo, raíz y hojas) en comparación a los otros, cuyo crecimiento fue estadísticamente igual. En conclusión, los rizobios favorecen el crecimiento de las plantas, sin embargo, un riego periódico de estos microorganismos en un medio líquido podría optimizar los resultados.

## **Justificación**

En Colombia, la agricultura es uno de los pilares para la economía, desarrollo rural y seguridad alimentaria. La producción de alimentos, fibras y materiales orgánicos derivados de la agricultura es fundamental para el desarrollo y la sostenibilidad del país, siendo una fuente clave de empleo e ingresos para familias, especialmente en las zonas rurales, para agricultores y campesinos. Destacando como uno de los principales productos, el cultivo del frijol (Colombia Verde, 2023).

El frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.) es una de las leguminosas más importantes en el mundo, además de ser un alimento básico en la dieta colombiana, al ser una fuente de proteínas, fibras naturales y complemento de los cereales y otras fuentes principales de carbohidratos (Grande et al., n.d.). Su cultivo y consumo se da mayormente en áreas rurales y comunidades vulnerables, y su producción estable es esencial para la seguridad alimentaria del país. Sin embargo, los agricultores enfrentan altos costos de producción de cultivos debido al uso de fertilizantes químicos, los cuales también deterioran la calidad del suelo y afectan al medio ambiente (Chávez-Díaz et al., 2020).

Uno de los problemas principales en la agricultura moderna es el uso excesivo e indiscriminado de fertilizantes químicos, los cuales, aunque inicialmente pueden mejorar el rendimiento de los cultivos, presentan serias consecuencias ambientales y a largo plazo. Cuando llegan a aplicarse sin medidas de control, los compuestos químicos alteran la estructura y composición del suelo, degradando la fertilidad natural de este (Bonilla,R., et al. 2021). A su vez, también contribuyen significativamente a la contaminación de cuerpos de agua, ya que los nutrientes, especialmente el nitrógeno y el fósforo, son fácilmente arrastrados por el agua de riego o las lluvias (Barajas, L.,2017). Además, se incluye el problema relacionado a sus costos de producción elevados (Chávez-Díaz et al., 2020).

Es por esto, que se buscan nuevas alternativas en los sistemas de producción de alimentos, como modelos sostenibles que aseguren a la seguridad alimentaria de la población al mismo tiempo que contribuya la restauración y preservación de la calidad del suelo y del agua (Grande et al., n.d.). Es así como surge la opción de sustituir los fertilizantes inorgánicos por biofertilizantes o fertilizantes orgánicos capaces de realizar la misma función, pero ecológicamente y a menores costos (Grande et al., n.d.).

Los biofertilizantes son un producto que contiene microorganismos vivos, que coloniza la rizosfera al ser aplicado en el suelo, las semillas o las raíces de las plantas. Fomentando el crecimiento de estas al mejorar la disponibilidad de nutrientes en el suelo sin dejar residuos químicos perjudiciales (Bonilla,R., et al. 2021). Su eficacia radica en las complejas interacciones entre suelo-planta-microorganismos-ambiente, las cuales influyen de manera significativa en el desarrollo y productividad de los cultivos. En la rizósfera (parte del suelo próxima a las raíces de la planta), habitan ciertos microorganismos poseen la capacidad de estimular el crecimiento y rendimiento de las plantas a través de mecanismos tanto directos como indirectos (Márquez, 2021). Estos microorganismos, conocidos como promotores del crecimiento vegetal (MPCV), desempeñan un papel clave en la agricultura sostenible al potenciar el desarrollo natural de los cultivos (Chávez-Díaz et al., 2020).

Una de las alternativas propuestas para el desarrollo de biofertilizantes se relaciona con el uso de bacterias en su producción, basándose en la capacidad de ciertos microorganismos para mejorar la disponibilidad de nutrientes en el suelo, promoviendo así un crecimiento saludable de las plantas (Moreno et al., 2018). Entre las bacterias más comunes en biofertilizantes están *Rhizobium*, *Azospirillum*, *Azotobacter*, y las bacterias promotoras del crecimiento de plantas (PGPB) (Márquez, 2021; Chávez-Díaz et al., 2020). Se ha reportado

que estas bacterias pueden afectar el desarrollo, el rendimiento y la absorción de nutrientes de las plantas a través de varios mecanismos. Algunas cepas bacterianas influyen directamente en la fisiología de las plantas al imitar la producción de hormonas vegetales, mientras que otras mejoran la disponibilidad de minerales y nitrógeno en el suelo, promoviendo así un mayor crecimiento (Baljeet Singh Saharan & Nehra, 2011).

La asociación *Rhizobium*-leguminosa es clave en suelos agrícolas para la fijación de nitrógeno, promoviendo el crecimiento, el número de nódulos radiculares y la disponibilidad de fósforo en el suelo (Chávez-Díaz et al., 2020). Sin embargo, los rhizobios nativos no siempre fijan suficiente nitrógeno, siendo efectivos solo en un 20-30% de los casos (Saharan & Nehra, 2011). Por ello, el uso de inoculantes de *Rhizobium* se considera una medida complementaria que reduce la dependencia de fertilizantes químicos, aumenta el contenido de nitrógeno, mejora el peso seco de los cultivos y asegura el rendimiento de las leguminosas (Grande et al., n.d.).

En este proyecto, la producción de un biofertilizante a base de *Rhizobium*, se presenta como una alternativa efectiva y sostenible, especialmente para cultivos de leguminosas, como una respuesta a reducir la dependencia de fertilizantes nitrogenados. Además, se busca evaluar su efecto en suelos extraídos de zonas de construcción, puesto que, Baljeet Singh Saharan & Nehra (2011), indican que hay evidencia de que la inoculación con bacterias estimula el crecimiento de las plantas de manera más efectiva en suelos con bajos niveles de nutrientes en comparación con suelos ricos en nutrientes.

Esto se realizará mediante el uso de técnicas biotecnológicas y microbiológicas accesibles, permitiendo que el proyecto sea replicable, adaptable y a su vez, se promueva el uso de prácticas sostenibles en la agricultura con el fin de recuperar suelos y fortalecer las capacidades técnicas agricultoras locales. De esta manera, al implementar este proyecto también se estaría contribuyendo al cumplimiento de objetivos de desarrollo sostenible planteados por la Organización de las Naciones Unidas (2015), los cuales son; Hambre Cero (ODS 2), Agua Limpia y Saneamiento (ODS 6) y Acción por el Clima (ODS 13), al promover una producción agrícola sostenible que conserva el suelo, reduce el uso de químicos y fortalece la seguridad alimentaria en Colombia.

### **Objetivo general**

- Producir a pequeña escala un biofertilizante a base de *Rhizobium*, micorrizas y compost para el crecimiento de frijol en suelos extraídos de zonas de construcción de la Universidad EIA.

## **Objetivos específicos**

- Aislar y caracterizar cepas de *Rhizobium*.
- Evaluar la actividad del biofertilizante en condiciones controladas.
- Medición de variables (crecimiento de tallo, raíz y hojas).
- Analizar el impacto del biofertilizante en las propiedades del suelo (pH).

## **Marco Teórico**

### **Fertilizante Químico Triple-15**

El fertilizante NPK conocido como "Triple 15" se caracteriza por tener una composición equilibrada de nitrógeno, fósforo y potasio, cada uno al 15%. Su fórmula específica incluye nitrógeno en dos formas: 6.11% en forma nítrica, que es rápidamente absorbida por las plantas, y 8.89% en forma amoniacal, que proporciona una liberación más lenta y prolongada. (Tecnoagrícola, n.d ). Los fertilizantes NPK son ampliamente usados en la agricultura para optimizar el crecimiento de las plantas, ya que el nitrógeno promueve el crecimiento vegetativo, el fósforo facilita la floración y formación de raíces, y el potasio mejora la calidad y el tamaño de los frutos. (Olagunju et al., 2023)

En la Conferencia de las Naciones Unidas sobre el Cambio Climático de 2021, se destacó la necesidad de reducir el uso de fertilizantes químicos, incluyendo aquellos que contienen nitrógeno, fósforo y potasio (NPK), debido a su impacto ambiental. A largo plazo, la aplicación constante de fertilizantes NPK puede alterar la composición y estructura de las comunidades bacterianas en el suelo, reduciendo la biodiversidad microbiana y acidificando el suelo, lo cual afecta negativamente su productividad. Estos cambios impactan la capacidad del suelo para mantener cultivos saludables y sostenibles, a la vez que aumentan la vulnerabilidad de las plantas, al debilitar los tallos y reducir la presencia de carbohidratos estructurales. Además, la elevada dependencia de fertilizantes a base de nitrógeno contribuye a la emisión de gases de efecto invernadero, exacerbando los problemas de cambio climático. (Carneiro et al., 2022)

Además de las preocupaciones ambientales, el uso de fertilizantes NPK implica un desafío económico. La producción de nitrógeno depende en gran medida de los precios del gas natural, y se teme una futura escasez de fósforo y potasio, lo que podría elevar los costos de producción agrícola y poner en riesgo la seguridad alimentaria global. Por ello, las políticas

internacionales buscan un compromiso entre la productividad agrícola y la preservación de los ecosistemas, promoviendo un enfoque más ecológico y sostenible en el manejo de fertilizantes. (Carneiro et al., 2022)

### **Biofertilizantes**

Los biofertilizantes son formulaciones que contienen microorganismos beneficiosos capaces de optimizar el suministro de nutrientes esenciales a las plantas, promoviendo su crecimiento y regulando adecuadamente su fisiología. Entre los principales agentes de biocontrol utilizados en estos productos se encuentran los hongos micorrízicos arbusculares (HMA), las rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal (PGPR) y los rizobios fijadores de nitrógeno (Ghany et al., 2013). Además, la transformación de residuos orgánicos biodegradables como el compost también pueden ser empleados complemento a los biofertilizantes, contribuyendo así a la mejora de la fertilidad del suelo y a prácticas agrícolas más sostenibles (Ayilara et al., 2020).

- **Compost**

El compostaje es un método seguro y eficaz para la gestión de residuos, que convierte materiales orgánicos complejos en productos orgánicos e inorgánicos mediante un proceso aeróbico realizado por microorganismos. Este proceso genera compuestos distintos de los presentes en suelos nativos, carbón y turbas, y transforma diversos desechos degradables en productos útiles y seguros, como biofertilizantes y enmiendas para el suelo. (Ayilara et al., 2020)

El compostaje comprende dos fases principales: la fase de descomposición y la fase de humificación. En la primera, la actividad microbiana descompone la mayor parte del material biodegradable, estabilizando el residuo orgánico. Durante la segunda parte, el material orgánico se convierte en sustancias húmicas. La fase de descomposición se desarrolla en tres etapas: mesófila, termófila y de enfriamiento, en las que la materia orgánica, tanto simple como compleja, se degrada. En la fase de humificación o maduración, la materia orgánica se reorganiza en moléculas estables. (Azim et al., 2017)

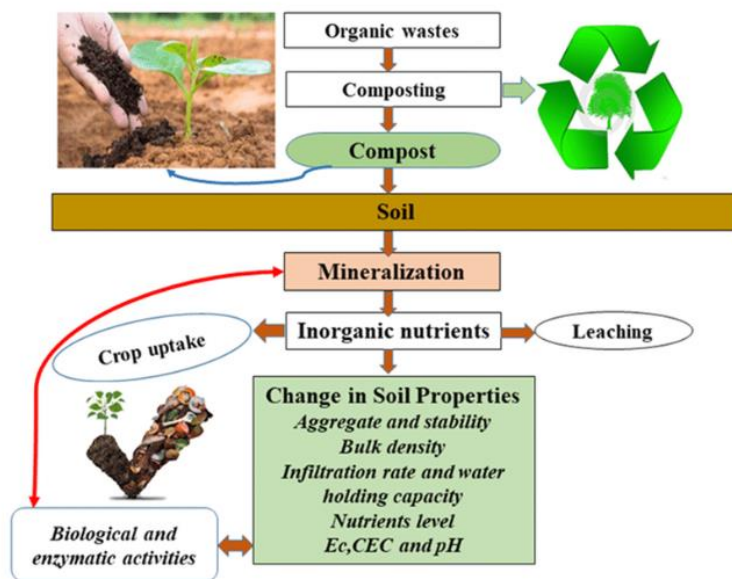


Figura 1. Diagrama esquemático del uso del compost. (Sayara et al., 2020)

El uso de compost contribuye a la productividad agrícola y aumenta el contenido de materia orgánica del suelo, mejorando su estructura y capacidad de retención de agua. El compost aporta nutrientes esenciales, favorece el crecimiento de microorganismos beneficiosos promotoras del crecimiento, incrementar fertilidad y favorece el desarrollo de las plantas, promoviendo una mejor aireación y retención de humedad, Igualmente es rico en humus, que mejora la cohesión de los componentes del suelo, actuando como un "pegamento" que estabiliza la estructura y los agregados del suelo, lo que mejora significativamente la calidad de la tierra para el cultivo. También actúa como fuente de nutrientes para plantas y microorganismos, lo que incrementa la producción de cultivos y representa una alternativa sostenible frente a los fertilizantes inorgánicos. (Hernández et al., 2016)

El uso de compost como fertilizante es una alternativa cada vez más valorada, impulsada en parte por la reciente campaña que desincentiva el uso de fertilizantes sintéticos. Majbar, et al. (2018) destacan que el compost mejora tanto la fertilidad del suelo como el rendimiento de los cultivos. Además, combinar compost con fertilizante sintético puede potenciar aún más el crecimiento de las plantas. La investigación sugiere que los fertilizantes sintéticos, por sí solos, pueden ser más efectivos que el compost en algunos casos; por ello, proponemos una aplicación combinada en proporciones adecuadas para aprovechar los beneficios de ambos (Ayilara et al., 2020).

Además de su función como fertilizante, el compost tiene aplicaciones en la biorremediación, el control de enfermedades y malezas, la prevención de contaminación, el control de erosión, el paisajismo y la restauración de humedales. Sin embargo, el compostaje tiene limitaciones: requiere tiempo para alcanzar su madurez, puede generar olores y patógenos termotolerantes, y, a veces, no contiene nutrientes suficientes. Estos aspectos han dificultado su adopción en favor de fertilizantes sintéticos, que son más rápidos y prácticos para muchos agricultores. (Ayilara et al., 2020)

El compost también fomenta microorganismos beneficiosos, como bacterias y hongos, que convierten sustancias insolubles en nutrientes para las plantas, degradan compuestos dañinos y mantienen la biodiversidad del suelo. Entre estos microorganismos, los hongos micorrícicos arbusculares (AMF) destacan, ya que facilitan la absorción de fósforo y otros nutrientes limitados para las plantas. La aplicación de compost en diferentes suelos ha demostrado ser efectiva para mejorar propiedades microbianas como la biomasa y la tasa de respiración, lo cual favorece todas las etapas de crecimiento de las plantas. (Sayara et al., 2020)

- **Micorrizas**

Las micorrizas representan asociaciones simbióticas entre hongos y la mayoría de las plantas terrestres, donde los hongos benefician el crecimiento y la salud de las plantas al ampliar la zona de absorción de nutrientes y agua en el suelo. Estas interacciones ocurren en las raíces y se caracterizan por el intercambio de recursos: el hongo, al acceder a una mayor extensión de la rizosfera, facilita la absorción de nutrientes esenciales, mientras que la planta le provee al hongo compuestos orgánicos derivados de la fotosíntesis y un ambiente seguro. Dentro de estas asociaciones, las micorrizas arbusculares son las más comunes y extensamente distribuidas, capaces de establecerse en una gran variedad de plantas y geografías. Su nombre proviene de los “arbusculos,” estructuras especializadas que se desarrollan en las células de la raíz y donde ocurre el intercambio directo de nutrientes entre ambos organismos (Yolai, 2009).

Además de mejorar la absorción de nutrientes como nitrógeno y fósforo, las plantas micorrizadas obtienen ventajas en la resistencia a condiciones adversas (Kuila & Ghosh, 2022). Las micorrizas aumentan la absorción de agua y la tolerancia a sequías, protegen contra patógenos del suelo y ayudan a las plantas a tolerar condiciones de salinidad y toxicidad por metales pesados. Esta simbiosis también fomenta la biodiversidad del suelo mediante la creación de redes micorrícicas comunes, las cuales interconectan diversas plantas y promueven la competencia y la diversidad vegetal, favoreciendo ecosistemas más resilientes. (Carrillo-

Saucedo et al., 2022) Además, protegen a las plantas contra patógenos, mejoran la calidad del suelo y aumentan el vigor y rendimiento de las plantas, lo que impulsa la intensificación agrícola sostenible. (Kuila & Ghosh, 2022)

Esta relación simbiótica también incrementa la producción de clorofila, carotenoides y compuestos fenólicos, fortaleciendo el crecimiento temprano y la salud reproductiva de las plantas. Ha demostrado efectos positivos en cultivos como tomate, arroz, maíz y papa, aumentando su crecimiento y productividad. La colonización por hongos micorrícicos mejora la calidad de los alimentos al elevar los niveles de antioxidantes y vitaminas (Kuila & Ghosh, 2022)

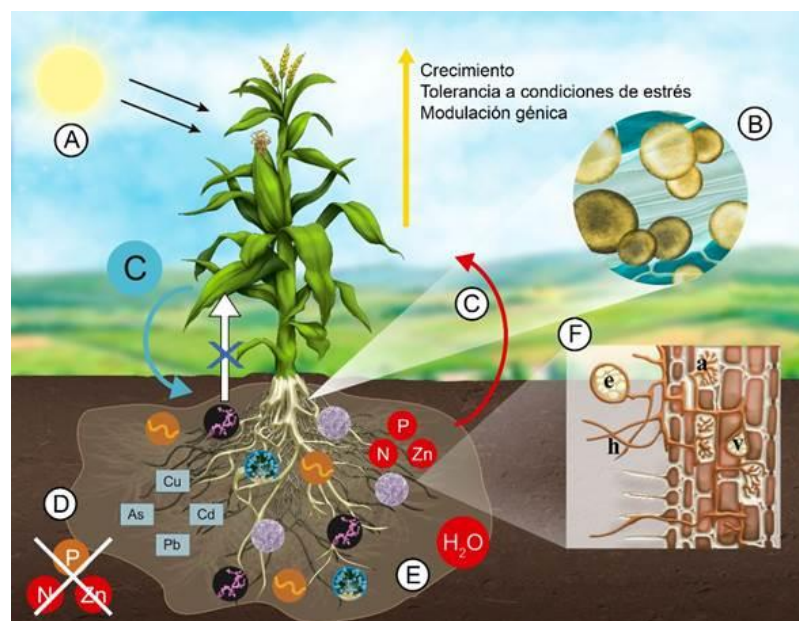


Figura 2. Micorrizas arbusculares y su papel en la nutrición de las plantas. Ilustración de Gustavo Armando Rodríguez Sánchez. (Carrillo-Saucedo et al., 2022)

La interacción simbiótica entre Micorrizas y plantas ocurre de la siguiente manera (Carrillo-Saucedo et al., 2022):

- A. Las plantas producen carbono (C) mediante el proceso de fotosíntesis, y una porción de este carbono se transfiere al hongo como carbohidratos a través de las raíces (indicado por la flecha azul).
- B. El micelio invade la raíz (F), comienza a expandirse y aumenta la capacidad de la planta para absorber nutrientes.



C. A su vez, el hongo micorrízico arbuscular (HMA) proporciona agua y nutrientes esenciales como fósforo (P), nitrógeno (N) y zinc (Zn) (indicado por la flecha roja).

D. Algunos nutrientes pueden estar fuera del alcance directo de la raíz (elementos tachados).

E. Esta interacción, junto con el microbioma (como *Rhizobium*), desempeña un papel en la bioacumulación de metales pesados (cuadros grises) como plomo (Pb), arsénico (As), cobre (Cu) y cadmio (Cd), además de facilitar el transporte de agua.

F. Estructuras típicas de los HMA en un corte longitudinal de raíz: espora (e), vesícula (v), arbusculo (a) y hifas (h). La relación con las micorrizas arbusculares también puede promover la expresión de genes específicos en el hongo, lo que contribuye a una mejor adaptación de la micorriza al entorno del suelo.

En países como Cuba, se han implementado productos comerciales basados en estos hongos, como EcoMic®, en cultivos de gran importancia económica. Este biofertilizante ha mostrado incrementos en los rendimientos entre el 15% y el 50%, mayor resistencia a la sequía y una reducción significativa en el uso de fertilizantes sintéticos. Esta aplicación exitosa, tanto en pequeña como en gran escala, destaca el papel de los AMF en la intensificación agrícola sostenible, promoviendo un uso eficiente y ecológico de los recursos para la producción de alimentos. (Yolai, 2009)

- **Rhizobium**

El nitrógeno es un nutriente esencial para el crecimiento de las plantas, siendo uno de los tres macronutrientes más importantes para su desarrollo. A pesar de que el 79% de la atmósfera está compuesta por nitrógeno, las plantas no pueden aprovechar directamente este gas (N<sub>2</sub>) (Yang et al., 2021). Sin embargo, algunas especies vegetales establecen una simbiosis con bacterias fijadoras de nitrógeno, principalmente del género *Rhizobium*, que son bacterias Gram negativas (Fauvart & Michiels, 2008), que transforman el nitrógeno atmosférico en amoníaco (NH<sub>3</sub>), una forma que las plantas pueden utilizar, a través de un proceso llamado fijación biológica simbiótica del nitrógeno (Yang et al., 2021).

La eficacia de esta simbiosis entre leguminosas y rizobios depende de interacciones moleculares complejas entre el huésped y las bacterias. En condiciones de deficiencia de nitrógeno, las raíces de las leguminosas liberan flavonoides en el suelo, lo que atrae a los rizobios e induce la secreción de factores Nod (NF). La recepción de estos NF por la raíz desencadena dos procesos: la infección bacteriana en la epidermis y la división celular en la

corteza para formar nódulos, donde los rizobios establecen su simbiosis. Dentro de los nódulos, las bacterias se transforman en bacteroides, que tienen la capacidad de reducir el nitrógeno a amoníaco en un ambiente con bajo oxígeno. Además, los haces vasculares que rodean los nódulos convergen hacia su extremo, facilitando el intercambio de nutrientes entre la planta y los rizobios (Yang et al., 2021).

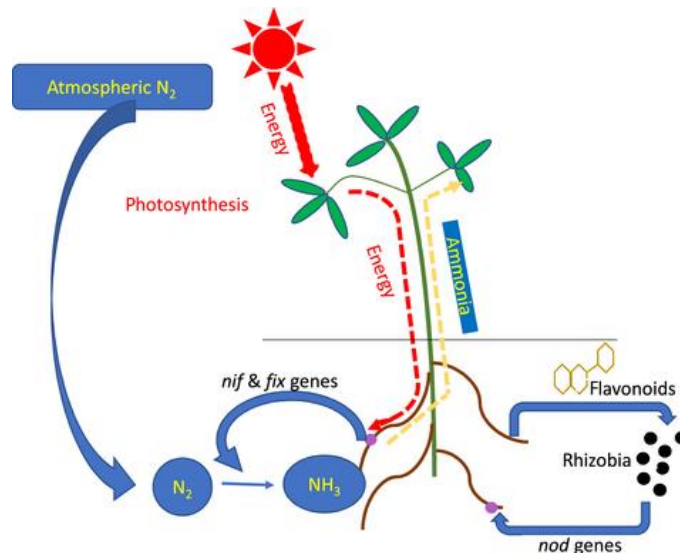


Figura 3. interacciones moleculares entre el huésped y bacterias (Lindström & Mousavi, 2019).

Por otro lado, numerosas especies bacterianas que habitan la rizósfera de las plantas promueven su crecimiento. Este grupo, conocido como rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal (PGPR), incluye a *Rhizobium*, que destaca por su capacidad para estimular, de manera directa o indirecta, el desarrollo de raíces y follaje. La estimulación indirecta se logra mediante mecanismos en los que las bacterias inhiben la actividad de hongos que afectan el crecimiento de las plantas. La estimulación directa involucra procesos como la fijación de nitrógeno, la producción de hormonas, enzimas, sideróforos y la solubilización de fosfatos (Santillana et al., 2016).

Sin embargo, diversas condiciones ambientales pueden interferir en este proceso. Factores como la disponibilidad de nitrógeno en el suelo, la acidez y salinidad de este, así como las bajas temperaturas, pueden afectar la capacidad de las leguminosas para establecer una simbiosis eficaz. Un exceso de nitrógeno en el suelo puede inhibir la capacidad de las plantas para formar nódulos funcionales, mientras que condiciones de acidez o salinidad dificultan la supervivencia de los rizobios. Las bajas temperaturas, además, reducen la actividad metabólica de las bacterias, afectando su capacidad para fijar nitrógeno. Comprender y manejar estos

factores es crucial para optimizar la fijación simbiótica de nitrógeno y asegurar el crecimiento adecuado de las plantas y una alta productividad agrícola en las leguminosas. (Abd-Alla et al., 2023)

### **Hipótesis**

La aplicación de un biofertilizante elaborado a base de *Rhizobium*, micorrizas y compost en suelos extraídos de zonas de construcción de la Universidad EIA mejora significativamente el crecimiento del frijol (*Phaseolus vulgaris*) en comparación con suelos tratados con fertilizantes convencionales y sin fertilización.

### **Metodología**

#### **Fase 1: Identificación y selección del microorganismo de interés (aislamientos a partir de plantas leguminosas: maní forrajero)**

Inicialmente se tomaron las plantas de maní forrajero y se cortaron las raíces, que posteriormente fueron lavadas para eliminar el exceso de tierra; luego, como muestra la figura 4 se extrajeron los nódulos y se depositaron en un beaker de 100 ml. Para la desinfección de estos nódulos fue necesario un procedimiento de lavado con distintos reactivos: primero se lavó con alcohol al 70%, se dejó actuar por 5 minutos y con ayuda de una pipeta Pasteur se eliminó el líquido residual; luego se añadió hipoclorito de sodio al 0.5%, se dejó actuar por 2 minutos y con una pipeta Pasteur se eliminó el líquido residual; por último, se lavó dos veces con agua destilada y se realizó el mismo proceso con la pipeta Pasteur.



Figura 4. Extracción de los nódulos del maní forrajero

Con los nódulos ya desinfectados, se prepara la muestra para ser cultivadas macerando los nódulos en un mortero y realizando diluciones  $10^{-1}$  y  $10^{-2}$  en solución salina (Figura 5) para proporcionar un ambiente osmótico más estable para los microorganismos.

Finalmente, con 1 ml se inoculan las dos diluciones y la muestra concentrada en el medio Agar manitol (Figura 6) y se incuba a temperatura ambiente en oscuridad.



Figura 5. Preparación de las diluciones en solución salina

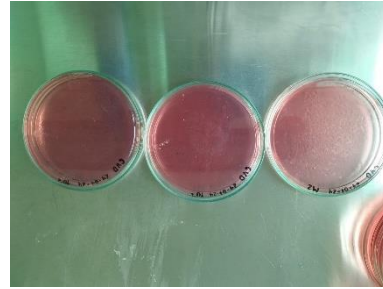


Figura 6. Cultivo de las tres muestras en Agar manitol

Después de una semana de incubación, en un Erlenmeyer de 250 ml se preparó un medio de cultivo líquido de manitol y sacarosa (además de otros reactivos) y se conservó hasta confirmar que los microorganismos aislados eran bacterias fijadoras de nitrógeno para poder cultivarlas. Entonces, se realizaron las siguientes pruebas para identificar si los microorganismos aislados eran bacterias fijadoras de nitrógeno pertenecientes al género *Rhizobium*:

- Identificación microscópica: Con un asa bacteriológica se tomó una colonia y se homogeneizó en un portaobjetos con una gota de agua, se fijó el frotis con un mechero, se realizó tinción de Gram (Figura 7) y se observó en el microscopio.
- Evaluación presencia de catalasa: Con un asa bacteriológica se tomó una colonia y se homogeneizó en un portaobjetos, con ayuda de una pipeta Pasteur se agregó una gota de peróxido de hidrógeno (Figura 8), en donde la formación o ausencia de burbujas representaban la presencia o ausencia de enzimas catalasas.

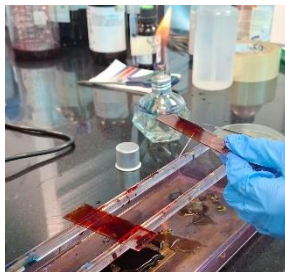


Figura 7. Proceso de tinción de Gram



Figura 8. Evaluación presencia de catalasas

- Evaluación fermentación de azúcares: Se tomaron dos colonias, se sembraron en dos placas de Petri con medio Agar McConkey (Figura 9) y se incubó durante una semana. La presencia de colonias rosadas o transparentes, representaban el crecimiento de bacterias gramnegativas que fermentan o que no fermentan lactosa, respectivamente.

Con el análisis de las primeras dos pruebas, se realizó el aislamiento de las colonias mucilaginosas cultivándolas nuevamente en el medio Agar manitol.



Figura 9. Cultivo de una colonia en medio Agar McConkey

- **Fase 2: Desarrollo del biofertilizante: Incluir algún portador (compost - micorrizas)**

Inicialmente se observó el crecimiento de los rizobios aislados y se tomaron varias colonias de los medios que no estaban contaminados para inocularlas en el medio líquido de manitol y sacarosa anteriormente preparado (Figura 10). El cultivo se dejó incubando en el shaker durante un día para favorecer el crecimiento de los rizobios en el nuevo medio de cultivo. Luego, se tomaron aproximadamente 5 kg de tierra infértil y árida, se le midió el pH y se colocó en la autoclave para eliminar cualquier presencia de microorganismos indeseados.



Figura 10. Cultivo de los rizobios aislados en medio líquido

- **Fase 3: Producción a pequeña escala (Diseño experimental)- Establecer indicador biológico**

Se estableció el indicador biológico a utilizar y se pusieron a germinar sus semillas unos días antes. Se identificaron los tres tratamientos a realizar: control, tratamiento 1 y tratamiento 2, –cada uno con tres repeticiones – y se etiquetaron las macetas respectivamente, como se muestra en la figura 11. A cada maceta se le agregó paja de arroz para mejorar la retención del agua y 500 g de tierra y a cada tratamiento se le agregó lo siguiente:

- Control: Indicador (3 semillas)
- Tratamiento 1: Indicador (3 semillas) + Fertilizante químico (1.5 g de triple 15)
- Tratamiento 2: Indicador (3 semillas) + Portador (10 g de compost y micorrizas) + Rizobios

Al control y al tratamiento 1 se les agregó agua y, por último, se colocaron todas las macetas en el vivero.



Figura 11. Macetas etiquetadas con sus respectivos tratamientos

- **Fase 4: Evaluación de condiciones controladas: Medir Variables**

Primero se tomó una alícuota de la tierra de todas las macetas; en un beaker de 100 ml se agregó la tierra de las tres macetas correspondientes a cada tratamiento y se revolvió (Figura 12). Luego, en una balanza analítica se pesaron 10 g de la tierra de cada tratamiento y se le agregó 10 ml de agua destilada a los tres beakers. Posteriormente se les agregó un imán y se colocaron en una plancha agitadora hasta mezclar bien, para después dejar asentar por 20 minutos. Pasado este tiempo, se midió el pH de los tres beakers correspondientes a cada tratamiento (Figura 13). Además, con un pie de rey se realizaron mediciones del tallo y las hojas de las plantas.





Figura 12. Beakers con tierra de las tres repeticiones de cada tratamiento



Figura 13. Ph-metro para la medición de pH de los tres tratamientos

Este mismo procedimiento se realizó 5 semanas después, con la adición de que se realizaron mediciones también a las raíces después de hacer el desmontaje (Figura 14).



Figura 14. Indicadores después de hacer el desmontaje para la toma de medidas

#### - **Fase 5: Análisis de Datos: Evaluar las diferencias entre los tratamientos**

Con las mediciones tomadas en la fase 4, se realizaron diseños de experimentos de tipo:

- Tallos: Diseño Completamente Aleatorizado (DCA). Para determinar el efecto del factor tratamiento (Control, Tratamiento 1 y Tratamiento 2) sobre el crecimiento del tallo medida en cada unidad experimental.
- Raíces: La prueba ANOVA unidireccional por rangos de Kruskal-Wallis. En la cual se realiza un análisis de varianza de un factor de tres niveles (Control, Tratamiento 1 y Tratamiento 2), para determinar la diferencia crecimiento de raíces.
- Área foliar: La prueba ANOVA unidireccional por rangos de Kruskal-Wallis. En la cual se realiza un análisis de varianza de un factor de tres niveles (Control, Tratamiento 1 y Tratamiento 2), para determinar la diferencia en el área foliar medida en cada unidad experimental.

## Resultados

- **Fase 1: Identificación y selección del microorganismo de interés (aislamientos a partir de plantas leguminosas: maní forrajero)**

Del cultivo de la muestra obtenida de los nódulos del maní forrajero, se obtuvieron varias colonias:

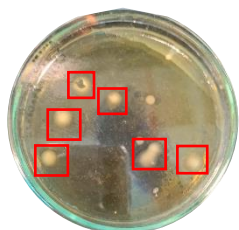


Figura 15. Placa de Petri con colonias de la muestra de nódulos

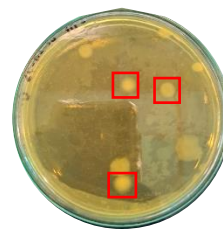


Figura 16. Placa de Petri con colonias de la muestra de nódulos

De estas colonias se aislaron las colonias mucilaginosas encerradas en rojo en otras placas de Petri, y también se usaron para las pruebas de confirmación de que dichas colonias pertenecían al género *Rhizobium*:

- Identificación microscópica:

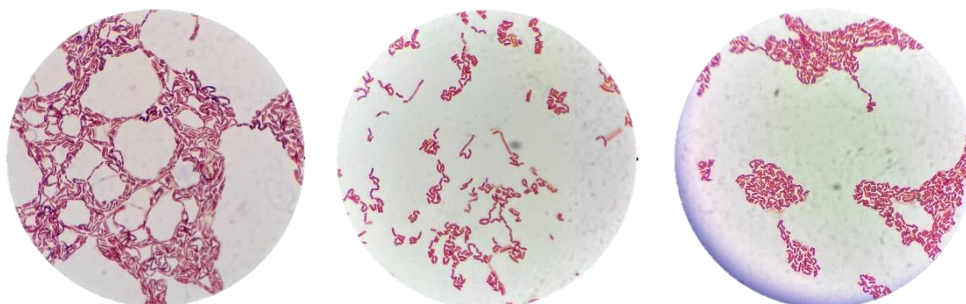


Figura 17. Visión en el microscopio de las colonias elegidas

- Evaluación presencia de catalasa:

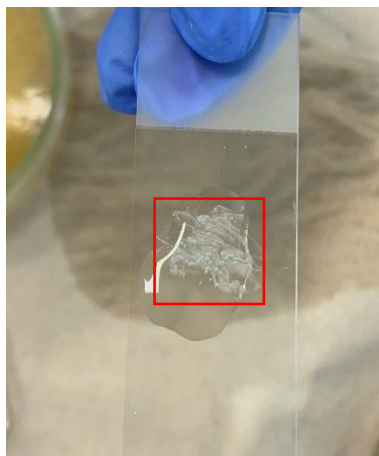


Figura 18. Presencia de burbujas en la muestra tras la adición de peróxido de hidrógeno



- Evaluación fermentación de azúcares:

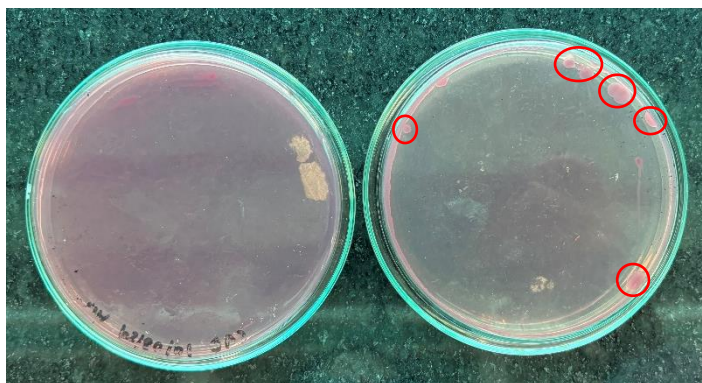


Figura 19. Crecimiento de colonias en el medio Agar McConkey

- **Fase 2: Desarrollo del biofertilizante: Incluir algún portador (compost - micorrizas)**
- Una semana después del aislamiento de las colonias mucilaginosas se obtuvo el siguiente crecimiento:



Figura 20. Crecimiento de rizobios en medio Agar manitol

Los portadores elegidos fueron compost y micorrizas

- **Fase 3: Producción a pequeña escala (Diseño experimental) - Establecer indicador biológico**



Figura 21. Macetas con sus respectivos tratamientos en el vivero

- **Fase 4: Evaluación de condiciones controladas: Medir Variables**

Los datos tomados en las mediciones se pueden observar en el Anexo 1.

Tabla 1. Mediciones del pH de la tierra donde: (Medición 1): antes de la siembra; (Medición 2): Una semana después de la siembra; (Medición 3): Seis semanas después de la siembra.

	Medición 1	Medición 2	Medición 3
Tratamiento 1	5.5	6.5	7.57
Tratamiento 2		8.2	7.43
Tratamiento 3		7.7	7.72



Figura 22. Crecimiento de los indicadores en la primera medición



Figura 23. Crecimiento de los indicadores en la segunda medición

- **Fase 5: Análisis de Datos: Evaluar las diferencias entre los tratamientos**

El código del diseño estadístico realizado se observa en el Anexo 2.

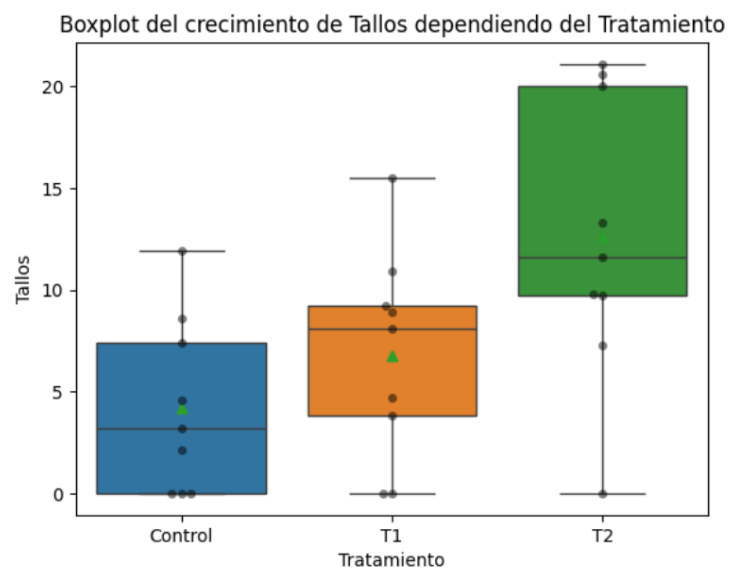


Figura 24. Diagrama de cajas y bigotes del efecto de los tratamientos en la longitud de los tallos

Tabla 2. Media y desviación estándar de las medidas de la longitud de los tallos según el tratamiento

	mean	std
<b>Control</b>	4.200000	4.292144
<b>T1</b>	6.788889	5.126511
<b>T2</b>	12.600000	7.032069

	df	sum_sq	mean_sq	F	PR(>F)
Tratamiento	2.0	333.094074	166.547037	5.306659	0.012349
Residual	24.0	753.228889	31.384537	NaN	NaN

Figura 25. Modelo ANOVA del crecimiento del tallo en distintos tratamientos

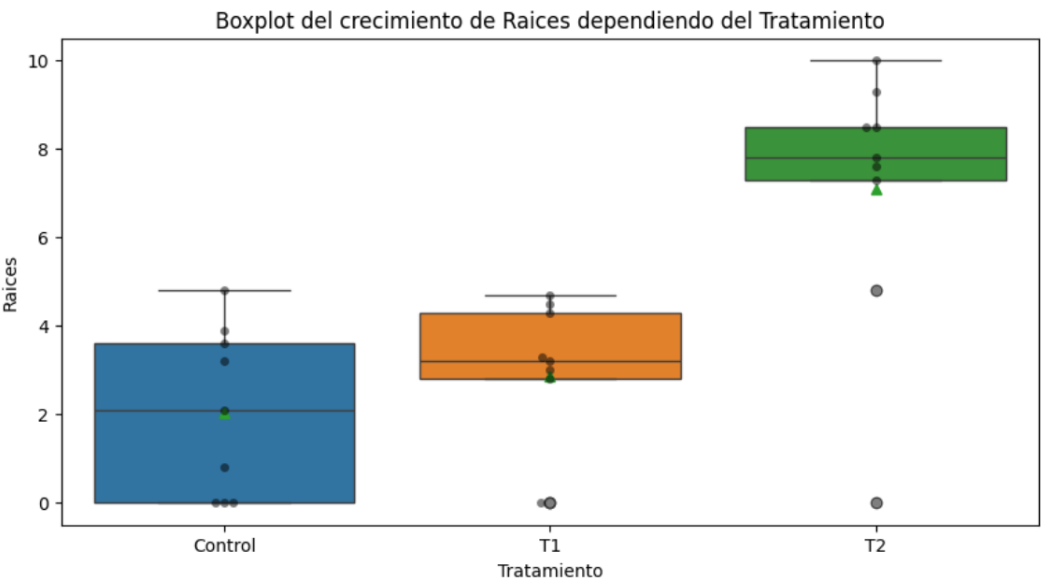


Figura 26. Diagrama de cajas y bigotes del efecto de los tratamientos en la longitud de las raíces

Tabla 3. Media y desviación estándar de las medidas de la longitud de las raíces según el tratamiento

	mean	std
<b>Control</b>	2.044444	1.900073
<b>T1</b>	2.866667	1.762101
<b>T2</b>	7.088889	3.034157

Estadístico de Kruskal-Wallis: 11.536819710383623  
p-valor: 0.0031247223267182483  
Existen diferencias significativas entre los tratamientos.

Figura 27. Prueba de Kruskal-Wallis del crecimiento de raíces en distintos tratamientos.

Prueba de Dunn-Bonferroni:

	Control	T1	T2
Control	1.000000	1.000000	0.004878
T1	1.000000	1.000000	0.022532
T2	0.004878	0.022532	1.000000

Figura 28. Prueba de Dunn-Bonferroni del crecimiento de raíces en distintos tratamientos

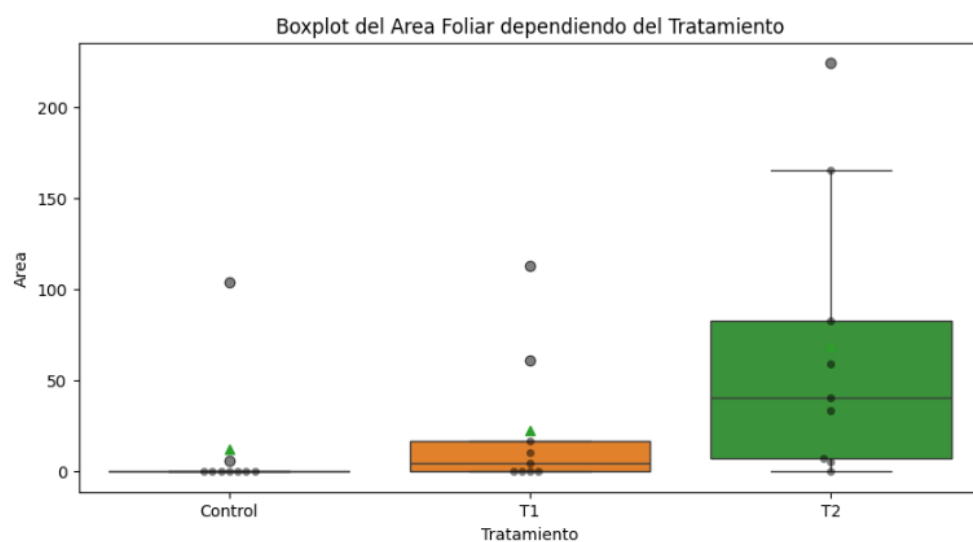


Figura 29. Diagrama de cajas y bigotes del efecto de los tratamientos en el Area foliar.

Tabla 4. Media y desviación estándar de las medidas de la longitud de los tallos según el tratamiento

	mean	std
<b>Control</b>	12.207889	34.557257
<b>T1</b>	22.893000	39.103234
<b>T2</b>	68.644556	77.827637

Estadístico de Kruskal-Wallis: 7.554589371980663

p-valor: 0.02288451756379585

Existen diferencias significativas entre los tratamientos.

Figura 30. Prueba de Kruskal-Wallis del área foliar en distintos tratamientos.

Prueba de Dunn-Bonferroni:			
	Control	T1	T2
Control	1.000000	0.769695	0.018694
T1	0.769695	1.000000	0.328264
T2	0.018694	0.328264	1.000000

Figura 31. Prueba de Dunn-Bonferroni del area foliar en distintos tratamientos.

## Discusión

- **Fase 1: Identificación y selección del microorganismo de interés (aislamientos a partir de plantas leguminosas: maní forrajero.**

### Identificación morfológica

En las placas del cultivo de las figuras 15 y 16, crecieron colonias que presentan características morfológicas compatibles con colonias típicas de bacterias del género *Rhizobium* o *Bradyrhizobium*, entre las características mencionadas por (Sosa et al., 2004), se incluyen: forma circular, convexas con bordes bien definidos, semitranslúcidas, mucilaginosas y colores que varían entre blanco y beige.

### Prueba de tinción de Gram.

Mediante la prueba de tinción de Gram, se logró identificar la posible presencia de *Rhizobium*. Aunque esta prueba no es concluyente, debido a la gran cantidad de microorganismos Gram negativos presentes en los suelos, sí puede indicar que el microorganismo aislado podría cumplir con las características morfológicas y tintoriales típicas de los rizobios, ya mencionadas por (Fauvart & Michiels, 2008). En la figura 17, se pueden observar bacilos Gram negativos, lo que sugiere la presencia de *Rhizobium* u otros microorganismos con características similares. Es importante destacar que, aunque la tinción de Gram es útil para este propósito, se requiere realizar pruebas bioquímicas adicionales.

### Evaluación de la presencia de la enzima catalasa

Se realizó la prueba de catalasa para determinar la presencia de la enzima catalasa en las bacterias, lo que proporciona información sobre sus características metabólicas y de respiración. La catalasa descompone el peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) en agua y oxígeno,

generando burbujas visibles en presencia de esta enzima (Soto Valenzuela et al., n.d.). La prueba resultó positiva, como se muestra en la figura 18, lo que indica la presencia de catalasa en las bacterias del género *Rhizobium*. Este resultado concuerda con la literatura, ya que, al ser bacterias aerobias, los rizobios necesitan catalasa para protegerse del estrés oxidativo causado por el peróxido de hidrógeno, un subproducto de la respiración aeróbica (J et al., 2017).

### **Evaluación de fermentación de azúcares (lactosa)**

Otra de las pruebas realizadas, fue la evaluación de fermentación de azúcar. Esta prueba se hizo mediante la siembra de algunas de las colonias escogidas de las muestras de nódulos (ver figuras 15 y 16) en agar MacConkey e incubación durante 1 semana. El agar MacConkey es un medio selectivo de bacterias Gram negativas, debido a las sales biliares y el cristal violeta que inhiben el crecimiento de bacterias Gram positivas, y diferencial, por la presencia de lactosa y un indicador de pH. Aquellas cepas capaces de fermentar el azúcar lactosa (Lac+) crecen con una coloración morada, mientras que aquellas incapaces de hacerlo son de color beige, blanco o amarillo (Agrícolas et al., 2007).

En la figura 19, se puede observar que no hubo un crecimiento de cepas de *Rhizobium*, ya que este género de bacterias al ser no fermentador de lactosa, en un medio como el agar MacConkey, las colonias de *Rhizobium* no cambiarían el color del medio a rosado o violeta, sino que permanecerían incoloras o pálidas (Mora, K. et al., 2013), sin embargo, si se evidencia el crecimiento de cepas restantes que si presentaron coloración violeta indicando la prueba positiva, lo que podría ser debido a contaminación.

### **- Fase 2: Desarrollo del biofertilizante: Incluir algún portador (compost - micorrizas)**

Se realizó la selección de las colonias bacterianas que crecieron en agar manitol a partir de las características relacionadas a las colonias de *Rhizobium* mencionadas anteriormente, tal y como se muestran en las placas de Petri de la figura 20. Cabe mencionar que se escogieron muestras únicamente de las placas 1 y 2, en las que se observan colonias redondas y opacas, con un crecimiento bien distribuido en el medio y de tamaño uniforme. Por otro lado, en la placa 3 se logra observar un patrón de crecimiento diferente, con colonias de apariencia irregular y variación en color que sugiere la presencia de contaminación, por lo que no se tomaron muestras de esta placa.

Por otra parte, en el contexto de biofertilizantes, el portador es el material que se utiliza para transportar y mantener organismos vivos. En cuanto a la selección de portadores, los elegidos fueron compost y micorrizas debido a las características ya mencionadas anteriormente por (Ayilara et al., 2020) y (Kuila & Ghosh, 2022).

- **Fase 3: Producción a pequeña escala (Diseño experimental) - Establecer indicador biológico.**

No hay resultados para discutir.

- **Fase 4: Evaluación de condiciones controladas: Medir Variables.**

En la semana 2 (Figura 22) se observa que en todas las macetas hay cierto crecimiento que no se ve diferenciado, sin embargo, en la figura 23, físicamente se puede observar que en el Tratamiento 2 hubo mayor crecimiento que en los otros dos.

- **Fase 5: Análisis de Datos: Evaluar las diferencias entre los tratamientos.**

- **PH:**

El frijol prospera en suelos profundos y fértiles, con buenas propiedades físicas y una textura franco-limosa, aunque también puede adaptarse a suelos franco-arcillosos (Teresita et al., 2007). En este experimento, se utilizó suelo franco-arcilloso extraído de una zona de construcción. Este tipo de suelo es pegajoso y maleable cuando está húmedo, pero se vuelve duro y agrietado al secarse. Los suelos franco-arcillosos son conocidos por su capacidad para retener agua, ya que drenan y se secan lentamente. (Briceño et al., 2012)

Como se muestra en la Tabla 1, en un principio la tierra extraída presentaba un pH de 5.5, lo cual está dentro del rango ideal para el desarrollo del frijol (5.5 a 6.5) (Teresita et al., 2007). Sin embargo, una semana después de la siembra, al medir nuevamente el pH, se observó una alcalinización generalizada del medio, siendo el grupo Control el único que presentó un pH dentro del rango ideal.

Se evidencia un aumento del pH en el grupo Control desde el momento que se tomó la tierra hasta la semana 6 de estar plantado el frijol, esta alcalinidad progresiva podría estar relacionada con factores como el riego con agua rica en sales, como el sodio, o el mal drenaje

característico del tipo de suelo utilizado, lo que podría ocasionar una acumulación de sales en la superficie y, en consecuencia, un aumento del pH. (Cherlinka, 2024)

De igual manera, en el tratamiento 2 hubo una alcalinización del medio gradual, además del factor previamente mencionado, relacionado con la acumulación de sales, este cambio también podría estar vinculado a la composición del compost, cuya exacta naturaleza no se conoce, de hecho, usualmente los compost son alcalinos debido a que contienen menor proporción de iones intercambiables de hidrógeno y mayor de calcio y magnesio, y en algunos casos también de sodio. (Bárbaro et al., 2019). Además, algunas investigaciones indican que las plantas y los hongos micorrízicos pueden modificar el pH de su entorno radicular (LebanonTurf, 2013).

Por otro lado, el pH del tratamiento 1 alcanzó un valor de 8.2 en la segunda medición, Este resultado no coincide con lo esperado, ya que la aplicación constante de fertilizantes NPK puede alterar la composición y estructura de las comunidades bacterianas del suelo, promoviendo la acidificación del suelo (Carneiro et al., 2022). Esta incongruencia también puede deberse a la acumulación de sales. Finalmente, la posterior disminución del pH en el tratamiento 1 podría deberse a la neutralización gradual de las sales acumuladas debido a la interacción con fertilizante químico.

#### – Tallos

En el análisis de las raíces en plantas de frijol, se observó en la figura 24 y la tabla 2, que las plantas en el grupo de Control mostraron una distribución del crecimiento de las raíces con los valores más bajos y una dispersión moderada. El Tratamiento 1 tuvo una media un 38% mayor que la del grupo Control, sin embargo, tiene valores medianamente dispersos. Por otro lado, el Tratamiento 2 fue el que tuvo mayor dispersión y mayores valores en cuanto a la longitud de los tallos, además, aunque la presencia de un 0 en las mediciones, arrastra la media hacia abajo y aumenta la desviación estándar, la media en el Tratamiento 2 fue casi el doble que la del Tratamiento 1 y tres veces la media del Control, lo que visualmente nos muestra que el Tratamiento 2 fue el que más influyó en el crecimiento de los tallos de las plantas.

Dado que los datos cumplen con todos los supuestos del modelo, el ANOVA tiene validez y mostró que al menos dos de los tratamientos tienen diferencias significativas (Figura 25). Posteriormente, la prueba de Dunnett se usó para identificar diferencias específicas entre los pares de tratamientos y el control. Los resultados indican que:



- No hay diferencias significativas entre el Control y el Tratamiento 1 ( $p=0.524$ ), lo que confirma que, en cuanto al crecimiento radicular, el Tratamiento 1 no tiene un efecto diferenciador.
- Existe una diferencia significativa en la longitud del tallo entre el Control y el Tratamiento 2 ( $p=0.0076$ ), lo que reafirma que el tratamiento 2 es efectivo para aumentar el crecimiento de los tallos en las plantas de frijol.

Por lo tanto, el tratamiento T2 tiene un efecto positivo en el crecimiento de las plantas en comparación con el Control.

#### - Raíces

En el análisis de las raíces en plantas de frijol, se observó que los tratamientos tenían efectos distintos. En la figura 26 y en concordancia con la tabla 3, las plantas en el grupo de Control mostraron una distribución del crecimiento de las raíces con bajos valores y alta dispersión, además, se observa que la media y la mediana están prácticamente en el mismo lugar, por lo que puede decirse que es una distribución simétrica. El tratamiento 1 presentó menor dispersión que el Control, y una distribución del crecimiento de las raíces con valores ligeramente mayores que el Control, con dos valores atípicos. Por su parte, el tratamiento 2 mostró una distribución menos dispersa, sin embargo, tiene dos valores atípicos que arrastran a la mediana, sin embargo, los valores de estas medidas de tendencia central (mediana y media) se mantuvieron significativamente mayores, sugiriendo que este tratamiento influyó significativamente en el crecimiento de las raíces en comparación con los otros grupos.

Dado que los datos no seguían una distribución normal por la presencia de valores atípicos, se utilizó la prueba de Kruskal-Wallis, que mostró que existen diferencias significativas entre los tratamientos (Figura 27). Posteriormente, la prueba de Dunn-Bonferroni se usó para identificar diferencias específicas entre los pares de tratamientos. Los resultados indican que (Figura 28):

- No hay diferencias significativas entre el Control y el Tratamiento 1 ( $p=1.0$ ), lo que confirma que, en cuanto al crecimiento radicular, el Tratamiento 1 no tiene un efecto diferenciador.
- Existe una diferencia significativa en la longitud de las raíces entre el Control y el tratamiento 2 ( $p=0.0049$ ), y entre el Tratamiento 1 y el Tratamiento 2 ( $p=0.0225$ ), lo

que confirma que el tratamiento 2 es efectivo para aumentar el crecimiento de las raíces en las plantas de frijol.

Por lo tanto, el tratamiento T2 parece tener un efecto positivo significativo en el crecimiento radicular en comparación con el Control y el Tratamiento 1, los cuales no tienen diferencias significativas entre sí.

#### - **Área Foliar**

En el análisis del área foliar en plantas de frijol, se observó que los tratamientos tenían efectos distintos. En la figura 29 y en concordancia con la tabla 4, las plantas en el grupo de Control mostraron una distribución de área foliar con valores bajos y poca variabilidad. El tratamiento 1 presentó una ligera dispersión, mayor que el Control, pero aún con la mayoría de los valores cercanos a cero. En cambio, el tratamiento 2 mostró una distribución mucho más amplia, con una mediana y variabilidad significativamente mayores, sugiriendo que este tratamiento tuvo un impacto positivo en el crecimiento del área foliar en comparación con los otros grupos.

Dado que los datos no seguían una distribución normal, se utilizó la prueba de Kruskal-Wallis, que mostró diferencias significativas entre los tratamientos (Figura 30). Posteriormente, la prueba de Dunn-Bonferroni se usó para identificar diferencias específicas entre los pares de tratamientos. Los resultados indican que (Figura 31):

- Existe una diferencia significativa en el área foliar entre el Control y el tratamiento 2 ( $p=0.0187$ ), lo que confirma que el tratamiento 2 es efectivo para aumentar el área foliar.
- No se encontraron diferencias significativas entre el Control y Tratamiento 1 ( $p=0.7697$ ), ni entre Tratamiento 1 y Tratamiento 2 ( $p=0.3283$ ), lo que sugiere que el efecto de T1 en el área foliar es similar al Control y menor que T2.

Por lo tanto, el tratamiento T2 parece tener un efecto positivo significativo en el crecimiento del área foliar en comparación con el Control, mientras que el tratamiento T1 no produce un cambio significativo respecto al grupo de Control.

Entonces, en las tres partes principales de la planta, se observó que el tratamiento que tuvo diferencias significativas del resto y que influyó positivamente al crecimiento de las plantas, fue el tratamiento 2. Esto no significa que el efecto de regar con un cultivo de rizobios

haya afectado la fisicoquímica de ese suelo infértil, pues, en este tratamiento se agregaron portadores como las micorrizas y el compost, que según Ayilara et al. (2020) y Kuila & Ghosh (2022) favorecen el correcto desarrollo de las plantas, incluso en condiciones adversas.

Por consiguiente, no se comprueba experimentalmente si regar un suelo con un cultivo de bacterias fijadoras de nitrógeno mejorará las propiedades del suelo, ya que también, al ser un suelo pobre en nutrientes, los microorganismos pudieron no adaptarse bien a las condiciones del suelo debido al cambio abrupto del medio de cultivo al suelo infértil, lo que puede reducir la viabilidad o actividad de estos microorganismos. Aun así, sí se comprobó que la mezcla de un cultivo de rizobios, micorrizas y abono, favorece el crecimiento de las raíces, el tallo y el área foliar de las plantas de frijol.

Por su parte, aunque en el tratamiento control hubo cierto crecimiento, en general, fue en el que hubo peor desempeño, significando que un suelo infértil limita el desarrollo de las plantas sin que se le haga un tratamiento previo a estos suelos. Por último, en cuanto al tratamiento 1, aunque favoreció levemente el crecimiento de las plantas, se observó que no tenía diferencia significativa con el grupo Control, por lo que tampoco es buena opción, ya que, aunque provee ciertos nutrientes (Olagunju et al., 2023), no enriquece suficientemente a un suelo prácticamente infértil.

Los resultados tanto del tratamiento 1 como del tratamiento 2 podrían no ofrecer suficiente claridad sobre su efectividad; esto porque sólo se agregaron en la primera instancia del proyecto y con el riego constante pudo haber migrado la población de los microorganismos y absorbido por completo la cantidad de fertilizante químico. Un riego periódico del cultivo de rizobios permitiría asegurar con mayor certeza que la presencia de estos microorganismos sí beneficia el crecimiento de los cultivos, o en su defecto, un pretratamiento que les permitiera a los microorganismos acostumbrarse gradualmente a las condiciones adversas del suelo a tratar, ya que esto aseguraría una supervivencia de los microorganismos en el suelo, y con esto, su replicación.

## **Conclusiones**

- El aislamiento de las cepas seleccionadas a partir del conocimiento de las características morfológicas, las pruebas bioquímicas como evaluar la actividad catalasa y fermentación de lactosa, además de pruebas de microscopía como la tinción de Gram lograron permitir el reconocimiento de posibles bacterias del género *Rhizobium* o *Bradyrhizobium* en los nódulos de maní forrajero.

- El tipo de suelo franco-arcilloso empleado, junto con la variación de tratamientos, influye significativamente en el pH del entorno radicular del frijol. A lo largo de las semanas, se observó un incremento en el pH de todos los tratamientos, fue de especial interés el tratamiento 1 con fertilizante NPK del que se esperaba una acidificación, sin embargo, probablemente a factores como la acumulación de sales en la superficie y las características de retención de agua del suelo al contrario de lo esperado se alcalinizó el medio.
- El tratamiento 2 mostró un desempeño significativamente superior en el crecimiento de raíz, tallo y hojas, promoviendo un sistema radicular extenso, un tallo más alto y un área foliar aumentada. Sin embargo, los resultados podrían no ser concluyentes, ya que los tratamientos se aplicaron solo al inicio y el riego constante pudo haber provocado la migración de microorganismos y la absorción completa del fertilizante, dificultando una evaluación precisa de su efectividad a largo plazo.
- El tratamiento Control, aunque mostró cierto crecimiento, fue el que presentó el peor desempeño, lo que sugiere que un suelo infértil limita el desarrollo de las plantas si no se aplica un tratamiento adecuado.
- Los inoculantes a base de rizobacterias representan una va alternativa biotecnológica para la agricultura sustentable, ya que no solo aumentan el rendimiento de los cultivos, sino que también reducen los costos de producción.

## **Recomendaciones**

- Un riego constante a los indicadores del tratamiento 2 con rizobios en medio líquido aseguraría la presencia constante de estos microorganismos en la tierra a tratar.
- Un pretratamiento de adaptación de los microorganismos al suelo favorecería su supervivencia en ese medio hostil.

## **Anexos**

Anexo 1. Datos de las mediciones: [mediciones ambiental.xlsx](#)

Anexo 2. Código diseño estadístico: <https://colab.research.google.com/drive/1aMIm-hGvoX9lbJMrSM8odzMvBnVhEEsF?usp=sharing>

## **Referencias**

Bárbaro, L., Karlanian, M., Rizzo, P., & Riera, N. (2019). CARACTERIZACIÓN DE DIFERENTES COMPOST PARA SU USO COMO COMPONENTE DE

- SUSTRATOS. *Chilean Journal of Agricultural & Animal Science*, ahead, 0.  
<https://doi.org/10.4067/s0719-38902019005000309>
- Carneiro, B., Cardoso, P., Figueira, E., Lopes, I., & Venâncio, C. (2022). Forward-looking on new microbial consortia: Combination of rot fungi and rhizobacteria on plant growth-promoting abilities. *Applied Soil Ecology*, 182, 104689.  
<https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2022.104689>
- LebanonTurf. (2013) *Mycorrhizal fungi and pH of soil or water*.  
<https://www.lebanonturf.com/education-center/biological-plant-treatments/mycorrhizal-fungi-and-ph-of-soil-or-water>
- Abd-Alla, M. H., Al-Amri, S. M., & El-Enany, A. E. (2023). Enhancing Rhizobium–Legume symbiosis and reducing nitrogen fertilizer use are potential options for mitigating climate change. *Agriculture*, 13(11), 2092.  
<https://doi.org/10.3390/agriculture13112092>
- Abdel Ghany, T.M., Alawlaqi, M.M. and Al Abboud, M.A. (2013) Role of Biofertilizers in Agriculture: A Brief Review. *Mycopath*, 11, 95-101.  
<http://111.68.103.26/journals/index.php/mycopath/article/viewFile/388/228>
- Agrícolas, D., Municipio, D., Sampedro, D., De, S., Charly, X., Contreras, J., Luis, I., Martinez, A., Paola, M., Acosta, U., De Sucre, F., De Educación, Y., Ciencias, P., De Biología, C., Énfasis, E., & Biotecnología. (2007). *ASLAMIENTO Y CARACTERIZACIÓN BIOQUÍMICA, FISIOLÓGICA Y MORFOLÓGICA DE GÉNEROS Rhizobium sp. Y Bradyrhizobium sp. ASOCIADOS A LA LEGUMINOSA Cajanus Cajan EN PARCELAS*.  
<https://repositorio.unisucro.edu.co/server/api/core/bitstreams/68c3e76e-c3d7-4b92-bf89-dd4487d55a5c/content>
- Ayilara, M., Olanrewaju, O., Babalola, O., & Odeyemi, O. (2020). Waste Management through Composting: Challenges and Potentials. *Sustainability*, 12(11), 4456.  
<https://doi.org/10.3390/su12114456>
- Azim, K., Soudi, B., Boukhari, S., Perissol, C., Roussos, S., & Alami, I. T. (2017). Composting parameters and compost quality: a literature review. *Organic Agriculture*, 8(2), 141–158. <https://doi.org/10.1007/s13165-017-0180-z>
- Baljeet Singh Saharan, & Nehra, V. (2011). Plant growth promoting rhizobacteria: a critical review. *ResearchGate*, 21, 1–30.  
[https://www.researchgate.net/publication/284340739\\_Plant\\_growth\\_promoting\\_rhizobacteria\\_a\\_critical\\_review](https://www.researchgate.net/publication/284340739_Plant_growth_promoting_rhizobacteria_a_critical_review)

- Barajas, L. N. A. (2017). Biofertilizantes: conceptos, beneficios y su aplicación en Colombia. *Ingeciencia*, 2(1), 65-76.  
[https://editorial.ucentral.edu.co/ojs\\_uc/index.php/Ingeciencia/article/view/2353/2177](https://editorial.ucentral.edu.co/ojs_uc/index.php/Ingeciencia/article/view/2353/2177)
- Bonilla, R. R., et al. (2021). *Bacterias promotoras de crecimiento vegetal en sistemas de agricultura sostenible*. Recuperado de: <http://hdl.handle.net/20.500.12324/36976>.
- Briceño, M., Álvarez, F., & Barahona, U. (2012). *Manual técnico de riego con énfasis en riego por goteo*. <https://bdigital.zamorano.edu/items/a6dce527-8541-44a5-bc77-5a25fa7506f8>
- Carrillo-Saucedo, S. M., Puente-Rivera, J., Montes-Recinas, S., & Cruz-Ortega, R. (2022). Las micorrizas como una herramienta para la restauración ecológica. *Acta Botanica Mexicana*, 129. <https://doi.org/10.21829/abm129.2022.1932>
- Chávez-Díaz, I. F., Zelaya Molina, L. X., Cruz Cárdenas, C. I., Rojas Anaya, E., Ruíz Ramírez, S., & De los Santos Villalobos, S. (2020). Consideraciones sobre el uso de biofertilizantes como alternativa agro- biotecnológica sostenible para la seguridad alimentaria en México. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*, 11(6), 1423–1436. <https://doi.org/10.29312/remexca.v11i6.2492>
- Cherlinka, V. (2024, February 2). Salinidad del suelo: cómo prevenirla y reducirla. *EOS Data Analytics*. <https://eos.com/es/blog/salinidad-del-suelo/>
- Colombia Verde. (2023, May 9). Colombia Verde.  
<https://colombiaverde.com.co/geografia/agricultura/importancia-de-la-agricultura-en-la-economia/>
- Fauvert, M., & Michiels, J. (2008). Rhizobial secreted proteins as determinants of host specificity in the rhizobium legume symbiosis. *FEMS Microbiology Letters*, 285(1), 1–9. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2008.01254.x>
- Grande, L., Lic, Alejandro, S., Garra, Profesor, A., Cu, I., & Miriela Rodríguez, P. (n.d.). *EL USO DE BIOFERTILIZANTES EN EL CULTIVO DEL FRIJOL: UNA ALTERNATIVA PARA LA AGRICULTURA SOSTENIBLE EN SAGUA MSc. Solande de la Cruz Martín*. Retrieved November 9, 2024, from [https://d1wqtxts1xzle7.cloudfront.net/78022838/gpm-libre.pdf?1641304677=&response-content-disposition=inline%3B+filename%3DEl Uso De Biofertilizantes en El Cultivo.pdf&Expires=1731188248&Signature=eo9977TftK5a6z6CbBkoAMSFJPHybMnMcwp](https://d1wqtxts1xzle7.cloudfront.net/78022838/gpm-libre.pdf?1641304677=&response-content-disposition=inline%3B+filename%3DEl%20Uso%20De%20Biofertilizantes%20en%20El%20Cultivo.pdf&Expires=1731188248&Signature=eo9977TftK5a6z6CbBkoAMSFJPHybMnMcwp)

[AJd03676DKo4PBVYbm-h8oXJlgeTlpRxoBvndVn0clO85s8zXeb6yB-05Ni5HjHkNWNKcBiwxZl1AJITgsHq7gT6k0rpW4bxdDH39zBGjyppO9STbwRbuHQNdIrUcZM6kJ2NboT0Shl0-Q2db99mBQbU1zlHXjPC1FGXR6fi1lRt7zHmJJ7dX4AhU8sjHWV1BgqUi8m8P0SL7I1xc~KZYO5ofgmLPSrsvle~65EzG2bKaPm9Hdii2Tb5xwRIW8as1HgQykCxRIA N1qTyTCUJcitYoaq7nqzpHps1YJaMHCqw0j6WOw &Key-Pair-Id=APKAJLOHF5GGSLRBV4ZA](https://doi.org/10.1016/j.still.2016.02.005)

Hernández, T., Chocano, C., Moreno, J., & García, C. (2016). Use of compost as an alternative to conventional inorganic fertilizers in intensive lettuce (*Lactuca sativa* L.) crops—Effects on soil and plant. *Soil and Tillage Research*, 160, 14–22.

<https://doi.org/10.1016/j.still.2016.02.005>

J, B. C., Galdo, Y., Mirabal, A., Quintana, M., & Puentes, A. (2017). Rizobios aislados de leguminosas forrajeras de un ecosistema ganadero árido de Holguín, Cuba. Tolerancia a estrés abiótico y producción de catalasa (Fase II). *Cuban Journal of Agricultural Science*, 51(1), 117–127.

[http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S2079-34802017000100013](http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S2079-34802017000100013)

Kuila, D., & Ghosh, S. (2022). Aspects, problems and utilization of Arbuscular Mycorrhizal (AM) application as bio-fertilizer in sustainable agriculture. *Current Research in Microbial Sciences*, 3, 100107. <https://doi.org/10.1016/j.crmicr.2022.100107>

Lindström, K., & Mousavi, S. A. (2019). Effectiveness of nitrogen fixation in rhizobia. *Microbial Biotechnology*, 13(5), 1314–1335. <https://doi.org/10.1111/1751-7915.13517>

Majbar, Z.; Lahlou, K.; Ben Abbou, M.; Ammar, E.; Triki, A.; Abid, W.; Nawdali, M.; Bouka, H.; Taleb, M.; El Haji, M. Co-compostaje de residuos de almazara y residuos de procesamiento de vino: una aplicación del compost como enmienda del suelo. *J. Chem.* **2018**, 2018, 7918583.

Márquez, A. (2021, February 9). *Rizosfera: qué es, para qué sirve, composición e importancia*. Ecologiaverde.com; Ecologiaverde.com. <https://www.ecologiaverde.com/rizosfera-que-es-para-que-sirve-composicion-e-importancia-3266.html>

Mora, K., Paccha, H., Chamba, C. C. S., & Gutiérrez, R. T. (2013) VARIABILIDAD DE AISLADOS DIAZOTRÓFICOS SIMBIÓTICOS EN DIFERENTES

CONDICIONES AGROECOLÓGICAS DEL SUR DEL ECUADOR VARIABILITY  
OF SYMBIOTIC DIAZOTROPHIC ISOLATES AT DIFFERENT  
AGROECOLOGICAL CONDITIONS OF SOUTHERN ECUADOR.

- Moreno Reséndez, A., García Mendoza, V., Reyes Carrillo, J. L., Vásquez Arroyo, J., & Cano Ríos, P. (2018). Rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal: una alternativa de biofertilización para la agricultura sustentable. *Revista Colombiana de Biotecnología*, 20(1), 68–83.  
<https://doi.org/10.15446/rev.colomb.biote.v20n1.73707>
- Noda, Yulai. (2009). Las Micorrizas: Una alternativa de fertilización ecológica en los pastos. *Pastos y Forrajes*, 32(2), 1. Recuperado en 06 de noviembre de 2024, de [http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0864-03942009000200001&lng=es&tlng=es](http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0864-03942009000200001&lng=es&tlng=es).
- Olagunju, S. O., Sosanya, O. S., Oguntade, O. A., Adewusi, K. M., Soremi, P. A., Joda, A. O., & Nassir, A. L. (2023). Effect of NPK fertiliser on upper and basal stem diameters and implication on growth habit of tomato. *Journal of the Saudi Society of Agricultural Sciences*. <https://doi.org/10.1016/j.jssas.2023.09.002>
- Organización de las Naciones Unidas. (2015). *Objetivos de desarrollo sostenible*. <https://www.un.org/sustainabledevelopment/es/objetivos-de-desarrollo-sostenible/>
- Santillana, N., Arellano, C., & Zúñiga, D. (2016). CAPACIDAD DEL Rhizobium DE PROMOVER EL CRECIMIENTO EN PLANTAS DE TOMATE (*Lycopersicon esculentum* Miller). *Ecología Aplicada*, 4(1-2), Pág. 47-51.  
<https://doi.org/10.21704/rea.v4i1-2.297>
- Sayara, T., Basheer-Salimia, R., Hawamde, F., & Sánchez, A. (2020). *Recycling of Organic Wastes through Composting: Process Performance and Compost Application in Agriculture*. <https://www.semanticscholar.org/paper/Recycling-of-Organic-Wastes-through-Composting%3A-and-Sayara-Basheer-Salimia/29e9a962949881112bd190841995dcbde0f4a5c6>
- Sosa, C., Elías, A., García, A., & Sarmiento, O. (2004). *Revista Cubana de Ciencia Agrícola*. *Revista Cubana de Ciencia Agrícola*, 38(2), 197–201.  
<https://www.redalyc.org/pdf/1930/193017901014.pdf>
- Soto Valenzuela, B., Borbor, G., & Borbor, V. (n.d.). *Identificación y caracterización de cepas nativas de Rhizobium en la Provincia de Santa Elena. (Avance de investigación) Facultad Ciencias Agrarias*.



<https://repositorio.upse.edu.ec/bitstream/46000/7270/1/UPSE-RCT-2013-Vol.1-No.1-007.pdf>

*Tecnoagícola (n.d )Producto: TRIPLE 15-15-15 vademécum Colombia.*

<https://www.buscador.portaltecnogricola.com/vademecum/col/producto/24579/TRIPLE%2015-15-15>

Teresita, R. M., Maribel, J. C., & Hernando, A. R. J. (2007). *Manual técnico buenas prácticas agrícolas (BBA) en la producción de frijol voluble.*

<https://repository.agrosavia.co/handle/20.500.12324/12691>

Yang, J., Lan, L., Jin, Y., Yu, N., Wang, D., & Wang, E. (2021). Mechanisms underlying legume–rhizobium symbioses. *Journal of Integrative Plant Biology*, 64(2), 244–267.

<https://doi.org/10.1111/jipb.13207>