

UNIVERSIDAD NACIONAL DE CAJAMARCA
FACULTAD DE CIENCIAS AGRARIAS
ESCUELA ACADÉMICO PROFESIONAL DE INGENIERÍA AMBIENTAL



T E S I S

“SUPERVIVENCIA DE *Rhizobium meliloti* EN COMPOST, ESTIÉRCOL DE LOMBRIZ Y TURBA”.

Para optar el Título Profesional de:

INGENIERO AMBIENTAL

Presentado por el Bachiller:

PABLO ENILCER RODRÍGUEZ BECERRA

Asesor:

Ing. M. Sc. ADOLFO MÁXIMO LÓPEZ AYLAS

CAJAMARCA – PERÚ

2019



UNIVERSIDAD NACIONAL DE CAJAMARCA

Norte de la Universidad Peruana
Fundada por Ley 14015 del 13 de febrero de 1962

FACULTAD DE CIENCIAS AGRARIAS

Secretaría Académica



ACTA DE SUSTENTACIÓN DE TESIS

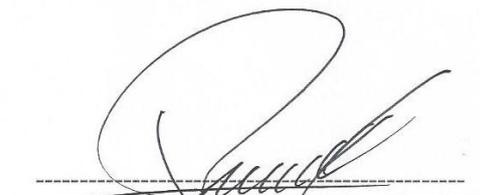
En Cajamarca, a los **veinticuatro** días del mes de **octubre** del año dos mil diecinueve, se reunieron en el ambiente 2C-211 de la Facultad de Ciencias Agrarias, los integrantes del Jurado designados por el Consejo de Facultad de Ciencias Agrarias, según Resolución de Consejo de Facultad N° 411-2019-FCA-UNC, de fecha 19 de agosto de 2019, con el objeto de Evaluar la sustentación de la Tesis titulada: “**SUPERVIVENCIA DE *Rhizobium meliloti* EN COMPOST, ESTIÉRCOL DE LOMBRIZ Y TURBA**”, para optar el Título Profesional de **INGENIERO AMBIENTAL**, del Bachiller: **PABLO ENILCER RODRÍGUEZ BECERRA**;

A las **diecisiete** horas y **tres** minutos y de acuerdo a lo estipulado en el Reglamento respectivo, el Presidente del Jurado dio por iniciado el acto. Después de la exposición del trabajo de Tesis, la formulación de preguntas y de la deliberación del Jurado, el Presidente anunció la **aprobación** por **unanimidad** con el calificativo de **dieciséis (16)**.

Por lo tanto, la graduando queda expedita para que se le expida el **Título Profesional** correspondiente.

A las **dieciocho** horas y **cuarenta** minutos, el Presidente del Jurado dio por concluido el acto.

Cajamarca, 24 de octubre de 2019.



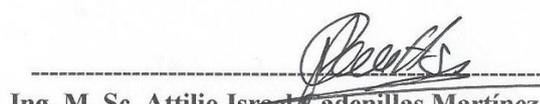
Dr. Manuel Salomón Roncal Ordoñez
PRESIDENTE



M. Sc. Jhon Víctor López Orbegoso
SECRETARIO



Ing. M. Sc. Víctor Eudelfio Torrel Pajares
VOCAL



Ing. M. Sc. Attilio Israel Cadenillas Martínez
ASESOR

DEDICATORIA

A Dios, por tanto amor incondicional, que nunca me soltó de la mano y me guiò para llegar hasta este punto y haberme dado salud, fuerzas y sabiduría para lograr mis objetivos.

A mis padres; Orfelinda Becerra Díaz y Francisco C. Rodriguez Penas, como muestra de mi más profundo amor y respeto. Por ser el pilar fundamental para alcanzar cada uno de mis logros, por su preciado apoyo moral, valores, consejos y la motivación constante que me ha permitido ser una persona de bien, pero más que nada, por regalarme tanto amor.

A mi hermana Meleyla, partiste dejando un gran vacío, me das las fuerzas que tanto me hace falta, este logro lo comparto contigo.

A mis hermanos, Doris, Elías, Alexander, Exilda y Erlin, por su comprensión, confianza y su desinteresado apoyo en cada momento.

A Karina, el más preciado amor que Dios me regalo, que me apoya y motiva en cada momento de mi vida, y por tu infinito amor.

AGRADECIMIENTOS

Mi más sincera gratitud a los Ingenieros: Attilio Cadenillas Martínez, Carlos Tirado Soto y Marcial Gallardo Aguilar, por las instrucciones, por el tiempo y entereza que me dedicaron en el asesoramiento del presente trabajo.

Agradezco a mis padres, hermanos y mi novia, quienes con su apoyo moral y espiritual me impulsaron a seguir adelante.

Las más expresivas gracias a José Villanueva Cotrina, un gran amigo quien con su apoyo y consejos me transmitieron conocimientos y ejemplo de profesionalismo.

A mis amigos y a todos aquellos que participaron directa o indirectamente en la elaboración de esta tesis.

RESUMEN

La presente investigación tuvo como objetivo determinar la supervivencia de *Rhizobium meliloti* en turba, estiércol de lombriz y compost. Para tal efecto se empleó el modelo de conteo en placas petri conteniendo medio de levadura-manitol-agar a través de diluciones (10^6 , 10^7 y 10^8), evaluándose las colonias en los respectivos sustratos en tiempo de “30, 60, 90 y 120 días”. Determinándose a los 30 días en compost una carga bacteriana de 7.0×10^{10} y en turba 2.6×10^{10} N° de rizobios/ gramo de sustrato. Con los tratamientos a_3b_2 , a_2b_2 , a_2b_1 , a_1b_3 , a_1b_4 , a_1b_2 , a_3b_3 de acuerdo al orden de significancia presentan cargas bacterianas superiores a los tratamientos a_2b_4 , a_2b_3 , a_3b_4 con cargas bacterianas de 1×10^9 , 7.8×10^8 y 4.2×10^8 N° de bacterias viables/gramo de sustrato respectivamente. A los 30 días después de la impregnación se obtiene la mayor supervivencia de *Rhizobium meliloti*/ gramo de sustrato, disminuyendo a medida que se incrementa el tiempo de almacenamiento del inoculante. A los 120 días la turba es el mejor soporte con una carga bacteriana de 2.8×10^9 N° de *Rhizobium*/ gramos de sustrato, siendo superior al estiércol de lombriz y compost con 7.8×10^8 y 4.0×10^8 *Rhizobium*/ gramos de sustrato respectivamente, sin embargo estos se encuentran dentro de los rangos aceptables internacionalmente para estudios de rizobios viables, que se considera de 2×10^7 *Rhizobium*/gramo de sustrato.

Palabras Claves: Supervivencia, *Rhizobium meliloti*, turba, estiércol de lombriz, compost.

ABSTRACT

The purpose of this research was to determine the survival of *Rhizobium meliloti* in peat, earthworm manure and compost. For this purpose, the petri dish counting model containing yeast-mannitol-agar medium through dilutions (10^6 , 10^7 and 10^8) was used, evaluating the colonies in the respective substrates in time of "30, 60, 90 and 120 days". A bacterial load of 7.0×10^{10} and peat 2.6×10^{10} Number of rhizobia / gram of substrate is determined at 30 days in compost. With treatments a_3b_2 , a_2b_2 , a_2b_1 , a_1b_3 , a_1b_4 , a_1b_2 , a_3b_3 according to the order of significance, they present higher bacterial loads than treatments a_2b_4 , a_2b_3 , a_3b_4 with bacterial loads of 1×10^9 , 7.8×10^8 and 4.2×10^8 No. of viable bacteria / gram of substrate respectively. At 30 days after impregnation, the greatest survival of *Rhizobium meliloti* / gram of substrate is obtained, decreasing as the inoculant storage time increases. At 120 days, peat is the best support with a bacterial load of 2.8×10^9 No. of *Rhizobium* / grams of substrate, being superior to worm and compost manure with 7.8×10^8 and 4.0×10^8 *Rhizobium* / grams of substrate respectively, without However these are within the internationally acceptable ranges for studies of viable rhizobia, which is considered 2×10^7 *Rhizobium* / gram of substrate.

Keywords: Survival, *Rhizobium meliloti*, peat, earthworm manure, compost.

ÍNDICE GENERAL

DEDICATORIA	ii
AGRADECIMIENTOS	iv
RESUMEN	v
ABSTRACT	vi
ÍNDICE GENERAL	vii
ÍNDICE DE TABLAS	ix
ÍNDICE DE FIGURAS	xi
CAPÍTULO I	1
INTRODUCCIÓN	1
1.1. Formulación del problema	2
1.2. Objetivo general	2
1.3. Hipótesis	2
CAPÍTULO II	3
REVISIÓN DE LITERATURA	3
2.1. Antecedentes de la investigación	3
2.2. Bases teóricas	4
2.2.1. Características generales del genero <i>Rhizobium</i>	4
2.2.2. Características generales de la turba	14
2.2.3. Características generales del compost	16
2.2.4. Características generales del estiércol de lombriz	20
CAPÍTULO III	23
MATERIALES Y MÉTODOS	23
3.1. Ubicación del estudio	23
3.2. Materiales	23
3.2.1. Material experimental	23
3.2.2. Materiales y equipos de laboratorio	24
3.2.3. Otros materiales	25
3.3. Metodología	26
3.3.1. Trabajo en campo	26

3.3.2. Trabajo de laboratorio	28
3.3.3. Trabajo de gabinete	39
CAPÍTULO IV	42
RESULTADOS Y DISCUSIONES	42
4.1. Determinación de la supervivencia de <i>R. meliloti</i> en los sustratos de turba, estiércol de lombriz y compost.	42
4.2. Comportamiento de la viabilidad para cada tipo de sustrato estudiados con los niveles de tiempo.	45
CAPÍTULO V	50
CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	50
5.1. Conclusiones	50
5.2. Recomendaciones	51
CAPÍTULO VI	52
LITERATURA CITADA	52
CAPÍTULO VI	58
ANEXOS	58
DATOS ORIGINALES DE LA INVESTIGACIÓN	59
GLOSARIO DE TÉRMINOS	60
RESULTADOS ORIGINALES DE LOS SUSTRATOS	62
PANEL FOTOGRÁFICO	65

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1.	Normas mínimas para Rizobios en diferentes países.	10
Tabla 2.	Ejemplo de obtención de diluciones para el recuento de rizobios en un inoculante sembrando diluciones de 10^4 a 10^8 , usando pipetas de vidrio de 1 ml, graduadas.....	13
Tabla 3.	Propiedades de las turbas rubias y negras.....	15
Tabla 4.	Condiciones ideales de compostaje.	17
Tabla 5.	Parámetros del compostaje	20
Tabla 6.	Análisis físico químico de la turba	26
Tabla 7.	Resultado de análisis físico químico de muestras del estiércol de lombriz.....	27
Tabla 8.	Resultado de análisis físico químico del compost	28
Tabla 9.	Contaje de colonias contaminantes en los sustratos esterilizados por 1 hora diaria durante 3 días consecutivos, después de 96 horas.	31
Tabla 10.	Contaje de colonias contaminantes del sustrato T ₂ esterilizados por 1 hora diaria durante 4 días consecutivos.	32
Tabla 11.	Factores, niveles y combinaciones de tratamientos.....	38
Tabla 12.	Análisis de variancia del DCR con arreglo factorial 3 x 4, prueba de F para la capacidad de sobrevivencia de N° bacterias/ gramo de sustrato de <i>Rhizobium meliloti</i>	39
Tabla 13.	Análisis de variancia del diseño factorial 3 x 4 de la supervivencia del N° de R. meliloti viables/ gramo de sustrato (datos transformados a \log_{10}).	42
Tabla 14.	Prueba de Rango Múltiple de Duncan de las medias en la supervivencia del R. meliloti.	43
Tabla 15.	Prueba de Rango Múltiple de Duncan con las medias para los 120 días de evaluación después de la impregnación del inoculante en cada uno de los sustratos.....	44
Tabla 16.	Viabilidad o supervivencia de R. meliloti por gramo del sustrato de turba después de la impregnación. (30,60, 90 y120 días).....	45
Tabla 17.	Viabilidad o sobrevivencia de R. meliloti por gramo de sustrato de estiércol de lombriz después de la impregnación.	47

Tabla 18.	Viabilidad o sobrevivencia de <i>R. meliloti</i> por gramo de sustrato compost después de la impregnación	48
Tabla 19.	Datos originales de la investigación	59

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.	Temperatura, oxígeno y pH en el proceso de compostaje según Román et al. (2013).....	18
Figura 2.	Procesos para la preparación de los sustratos a base de turba, estiércol de lombriz y compost.....	29
Figura 3.	Diluciones del sustrato.....	31
Figura 4.	Dilución del medio del <i>Rhizobium</i> para el conteo del número de bacterias por mililitro.....	33
Figura 5.	Esquema de las diluciones y de la siembra, en un recuento de células de rizobios en cajas petri.....	36
Figura 6.	Supervivencia del <i>Rhizobium</i> con las medias de los sustratos para 30, 60, 90 y 120 días.....	44
Figura 7.	Viabilidad o supervivencia de <i>R. meliloti</i> por gramo de sustrato turba después de la impregnación.....	46
Figura 8.	Viabilidad o supervivencia de <i>R. meliloti</i> por gramo de sustrato estiércol de lombriz después de la impregnación. Datos transformados a Log10.....	47
Figura 9.	Viabilidad o supervivencia de <i>R. meliloti</i> por gramo de sustrato estiércol de lombriz después de la impregnación. Datos transformados a Log10.....	48
Figura 10.	Análisis físico químico del sustrato turba.....	62
Figura 11.	Análisis físico químico del sustrato estiércol de lombriz.....	63
Figura 12.	Análisis físico químico del sustrato compost.....	64

CAPÍTULO I

INTRODUCCIÓN

La disponibilidad de nitrógeno en suelos es uno de los principales factores que limita la producción de los cultivos. Esto conlleva a la utilización indiscriminada de fertilizantes de síntesis química para mejorar la calidad de sus cultivos, siendo más costosa y poco amigable con el medio ambiente (Marín *et al.* 2003).

Esta situación ha generado la tendencia hacia el desarrollo de tecnologías que involucran el uso de diferentes microorganismos (rizobios) con potencial biofertilizante (Rebah *et al.* 2007). Estos se revelan como una estrategia importante para lograr una agricultura sustentable (Peralta 2007).

En la actualidad la turba es fuente de soporte para la producción de biofertilizantes, debido a que permite la multiplicación y viabilidad del género *Rhizobium* para la producción y comercialización de volúmenes de inoculantes de calidad (Vilela 1999).

La disponibilidad de turba en diferentes lugares del país, como en la región Cajamarca, se está perdiendo como consecuencia de la explotación minera, acarreo indiscriminado a las zonas donde se produce el cultivo de los *Vaccinium myrtillus* “arándanos”. El compost, estiércol de lombriz son accesibles y se puede utilizar de soporte para la multiplicación del género *Rhizobium* como alternativa de producción de biofertilizantes, a nivel comercial. Estos poseen un alto contenido de materia orgánica (> 25 %), capacidad de retención de humedad y un pH adecuado (6.5-8.5) para la supervivencia de los mismos.

Esta investigación permitió determinar la supervivencia de *Rhizobium meliloti* en compost, turba y estiércol de lombriz. El estudio tiene como importancia brindar una alternativa de solución de sustratos para remplazar a la turba en la producción de inoculantes. Con la aplicación de estos, se contribuirá a la disminución de la fertilización química nitrogenada, impulsando el equilibrio en el ecosistema y contribución a mejores rendimientos, sin provocar deterioro de las capacidades productivas del suelo, lixiviación y eutrofización de fuentes hídricas.

1.1. Formulación del problema

¿Cuál es la supervivencia de *Rhizobium meliloti* en compost, estiércol de lombriz y turba?

1.2. Objetivo general

Determinar la supervivencia de *Rhizobium meliloti* en compost, estiércol de lombriz y turba.

1.3. Hipótesis

Rhizobium meliloti tiene mejor supervivencia en la turba que en estiércol de lombriz y compost.

CAPÍTULO II

REVISIÓN DE LITERATURA

2.1. Antecedentes de la investigación

Cozzi y Benintende (1989) estudió la evolución de tres cepas de *Rhizobium meliloti* en turba, analizando la incidencia de la temperatura de almacenamiento, las concentraciones rizobianas fueron determinadas después de la preparación de los inoculantes, a los 60, 120 y 180 días de almacenamiento. Evidenciando al cabo de 180 días concentraciones bacterianas no menores a 1×10^8 rizobios viables por gramo de sustrato.

En un estudio de sobrevivencia de cepas de *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* en turba esterilizada y en semillas de *Trifolium pratense* “trébol rojo”, por el método de recuento en placas petri, a los 15, 30, 60, 90, 120, 150 y 180 días. Dando como resultado a los 30 días del periodo de maduración un aumento acentuado del número de células, los tratamientos mostraron un número de bacterias por gramo de sustrato superiores a 10^9 demostrándose la ventaja del soporte esterilizado y del almacenamiento de los inoculantes (Santillana y Freire 1995).

Vilela (1999) desarrolló un comparativo de excretas de lombriz y turba para determinar su calidad en la producción de biofertilizantes. Obteniendo a los 90 días de la impregnación $8,30 \times 10^8$ células viables por gramo de sustrato, disminuyendo el número de bacterias a medida que incrementa el tiempo de almacenamiento del inoculante, llegando a una carga bacterial de $1,90 \times 10^8$ /gramo de sustrato, encontrándose dentro de los rangos aceptados internacionalmente.

Chipana (2003) realizó una investigación en la “Optimización de parámetros para la producción de *Rhizobium meliloti* en una fermentación discontinua”, donde obtuvo una máxima producción de $2,53 \times 10^9$ cel/ml. Los valores óptimos de temperatura y aireación obtenidos fueron: 30°C y 1 vvm (volumen de aire por volumen de medio por minuto) respectivamente.

2.2. Bases teóricas

2.2.1. Características generales del genero *Rhizobium*

El *Rhizobium* es una bacteria no esporulante (FAO 1995), algunas veces pleiomórfico, móvil por flagelos peritricos o un solo flagelo lateral (Peralta 2007). De 0.5 a 0.9 μm de ancho y 1.2 a 3.0 μm de largo (Alexander 1980). Kuykendall *et al.* (2005) alude que son bacilos de 0.5-1.0 a 1.2-3.0 μm .

Estos microorganismos son gram negativas y aeróbicos que se conocen con el nombre de bacterias fijadoras de nitrógeno y forman una asociación simbiótica con distintas especies de plantas tetraploides (Ruiz y Tresierra 2011).

Taxonomicamente se incluye en la división Proteobacteria, mayoritariamente en α -Proteobacteria, en el orden de Rhizobiales, familia Rhizobiaceae y con siete géneros: *Bradyrhizobium*, *Mesorhizobium*, *Rhizobium*, *Sinorhizobium*, *Azorhizobium*, *Methylobacterium* y *Devosia*, y en β -Proteobacteria con dos géneros recientemente descritos *Burkholderia* y *Wautersia* (Lloret y Martinez 2005).

2.2.1.1. *Rhizobium meliloti*.

Esta especie presenta dos grupos definidos que pudieran resultar dos especies diferentes (Bécquer 2004), posee un genoma tripartito de 6,7 megabases (Mb); constituido por un cromosoma de 3,65 Mb y dos megaplásmidos denominados pSymA y pSymB, de tamaños 1,53 y 1,68 Mb, respectivamente. Que contribuyen, en grado variable, a la capacidad del microorganismo de establecer la interacción con la planta hospedera (Galibert *et al.* 2001).

Goicochea *et al.* (2016) menciona que esta especie habita en el suelo bajo una forma de vida libre saprofítica, o bajo ciertas condiciones, logra establecer una interacción simbiótica con plantas leguminosas de los géneros *Medicago*, *Melilotus* y *Trigonella* (Horvarth *et al.* 1986 y Roumiantseva *et al.* 2002). La relevancia de *R. meliloti* es la simbiosis con leguminosas que llevan a cabo la fijación biológica del nitrógeno (Lagares 2015). Además es capaz de acumular y degradar glucógeno y polihidroxibutirato (PHB) y sintetiza adicionalmente lipopolisacáridos, β -1,2-glucano cíclico, y exopolisacáridos (EPS) que excreta al medio extracelular (Zevenhuizen 1981).

2.2.1.2. Metabolismo

Su alimentación lo realizan por osmosis, a través de la membrana, para que cumplan esta fijación (el paso del agua tiende a equilibrar la célula tendiendo al medio isotónico), requiere que las sustancias sean difusibles (expandibles), siendo el elemento principal el agua, calcio, nitrógeno y sales de potasio, Magnesio, Silicio; utilizan el oxígeno para la respiración y producción de adenosín trifosfato para la fijación del nitrógeno (Ayala, citado por Calla 1997).

Posee una respiración aeróbica con el oxígeno como aceptor terminal de electrones, la temperatura óptima de crecimiento está entre 25 y 30 °C; algunas especies pueden crecer a temperaturas de 40 °C, el pH óptimo está entre 6.0 y 7.0, el tiempo de generación de las cepas de *Rhizobium* está entre 1.5 -5.0 horas (Kuykendall *et al.* 2005).

Brock y Madigan (1993) menciona que se multiplican por división o fisión binaria a través de la cual la célula madre al alcanzar un determinado volumen se divide dando origen a dos células hijas. Este proceso consiste en la autoduplicación del material hereditario para formar dos células iguales independientes.

2.2.1.3. Caracterización del *Rhizobium* sp

Purificación

Para la purificación de una colonia es necesario resembrar varias veces, a partir de una colonia, la cual se debe sembrar en forma de estrías, en placas petri con medio de cultivo. Describir las características de las colonias (aparición, elevación de la colonia, color, tipo de borde y diferenciación entre estas), también determinar la alcalinidad o acidez; los cultivos deberán ser examinados bajo la reacción gram (CIAT 1988).

Caracterización

En la mayoría de bacterias del género *Rhizobium* las colonias permanecen blancas, u ocasionalmente rosadas; sin embargo, esta reacción depende de la concentración correcta del rojo congo en el medio de cultivo y la edad. Los organismos contaminantes absorben el tinte rojo, propiedad que permite diferenciarlos de los rizobios. Los de crecimiento lento producen alcalinidad y cambian el color del medio (levadura-manitol agar) a azul, mientras que los de crecimiento rápido producen

acidez y cambian a color amarillo. El medio levadura – manitol – agar (LMA) de pH 5.5 con purpura de bromo cresol (PBC) es de color habano; las cepas que producen alcalinidad cambian ese color a morado, y las que producen acidez lo cambian a amarillo (CIAT 1988).

2.2.1.4. Selección del *Rhizobium* sp

La selección de cepas de rizobios para desarrollar inoculantes para leguminosas tienen que ser seleccionados por; eficiencia simbiótica, competencia en la nodulación, competencia saprofítica, compatibilidad interespecífica, estabilidad genética, comportamiento industrial, sobrevivencia en el soporte y semillas y tolerancia a factores bióticos y abióticos (Delgado *et al.* 2007) y para ser comercializados tener en cuenta el medio ecológico donde se desarrolla la simbiosis, resistencia a la salinidad, a la acidez y a altas temperaturas (Labandera *et al.* 1970).

Eficiencia

La estimación de la cantidad de nitrógeno proveniente de la fijación biológica (FBN) se realiza mediante el uso del isótopo estable ^{15}N y cuantificación de la reducción de acetileno. La prueba mejor implementada y definitiva, son los ensayos de siembra en los que se mide la materia seca de la parte aérea, en las raíces y en los nodulos de las leguminosas (Camargo 2011).

Estabilidad genética

La estabilidad genética es necesaria para que se conserven las características por las cuales fueron seleccionadas las cepas (Fillat y Puppo 1994). Estas al ser utilizadas en la producción de inoculantes deben ser genéticamente estables y almacenarse de una manera que se prevenga su contaminación, su mutación o su muerte, para ello existe tres métodos de almacenamiento: refrigeración en tubos, desecación en fragmentos de porcelana, y liofilización (Labandera y Vincent 1975), el tiempo en que los rizobios conservan la estabilidad y la viabilidad se incrementa del primer método hasta el tercero (CIAT 1988).

Comportamiento industrial

El comportamiento industrial de una cepa se considera apto cuando esta tiene un crecimiento rápido y logra una concentración de bacterias adecuadas en medio de cultivo, siendo capaces de dispersarse y sobrevivir en el soporte empleado (Camargo 2011). Los análisis recomendados de los biofertilizantes antes de su distribución es el recuento de contaminantes, recuento del número del microorganismo, la capacidad de infectar, colonizar o formar nódulos en distintas plantas hospederas, o según sea el caso (Zúñiga 2007).

Sobrevivencia en semillas

La efectividad de rizobios en los inoculantes se relaciona con la cantidad de bacterias provistas sobre las semillas, es por ello que en diferentes países tienen normativas vigentes que establecen que las semillas pre-inoculadas y/o peleteadas deben tener un número mínimo de bacterias viables en el momento de siembra, que es de 80.000 UFC/semilla para semillas tamaño de la *Glycine max* “soya” (5–11 mm de diámetro) y de 1.000 UFC/semilla para semillas tamaño de la alfalfa (1,5 a 2,5 mm. de longitud), dato para el caso de argentina (Corvalan *et al.* 2007).

Habilidad para sobrevivir en el soporte

Las cepas deben ser capaces de sobrevivir adecuadamente en el soporte utilizado, manteniendo concentraciones por encima del estándar exigido durante el periodo de comercialización, con una cantidad mínima de 2×10^7 rizobios/gramo de inoculante (CIAT 1987). La elección cuidadosa del soporte resulta importante para la calidad del inoculante (Ruíz *et al.* 1979). Los biofertilizante para tener éxito de sobrevivir radica en la preservación de la efectividad de los microorganismos, que se determina a través de análisis moleculares tales como la presencia de plásmidos simbiótico. Sin embargo, se debe realizar análisis físico químicos tales como el pH final del medio de cultivo y la humedad, la conductividad eléctrica y presencia de metales pesados (Zúñiga 2007).

2.2.1.5. Requerimientos nutricionales para el *Rhizobium* sp

Las bacterias del genero de *Rhizobium* utilizan una amplia gama de carbono, el *R. meliloti* utiliza azucres, polioles (alcoholes con más de dos grupos hidroxilo) y ácidos orgánicos. La utilización de fuentes nitrogenados inorgánicos (NH_4^+ – NO_3^-) para un óptimo desarrollo, siendo necesaria la incorporación de una o más vitaminas en los medios de cultivo para un adecuado crecimiento. También se emplea compuestos como fuente mineral, sales (K_2HPO_4 , $\text{FeCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, $\text{CaCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$). Así como otros requerimientos como el oxígeno, iones de hidrogeno y la temperatura (Labandera 1982).

2.2.1.6. Preparación de inoculantes

Inoculante

Es un producto biológico vivo (FAO 1995). Resulta de la mezcla de un cultivo de una cepa de *Rhizobium* sp. con un soporte, su función es permitir la supervivencia y la fácil manipulación de los rizobios para asociarlos con la leguminosa deseada, deben ser específicos y seleccionados a base de cepas de alta eficiencia, para ser específico y altamente efectivo CIAT (1987) y (La Rosa 1982).

Preparación

En la actualidad los inoculantes en polvo son los más usados (FAO 1995). Se almacena a 4 °C en bolsas de plástico para evitar la desecación. Cuando se trata de cultivos puros, la turba se envasa previamente en bolsas de polietileno y es esterilizada, se inyecta asépticamente el volumen correspondiente del caldo, luego se sella el orificio y las bolsas se manipulan hasta que el inóculo adquiera una textura adecuada, pasando a incubarlos a 25-30 °C, durante 2 a 3 semanas para su multiplicación y se almacena a 45 °C (Ayala 1982), hasta su distribución contemplándose una fecha de expiración de seis meses con soporte esterilizado (Labandera 1994).

Para asegurar una buena supervivencia de los rizobios, el principal criterio es la elección del soporte o sustrato. Para hacer una rápida selección deben considerarse características como:

- a. Contenido de materia orgánica (= 40 %).
- b. pH alrededor del punto de neutralidad (entre 6 y 7; 5,4 para *R. meliloti*, ocho o más para *Lotononis platycarpus*).
- c. Bajo contenido de sales; sin embargo los valores de inhibición varían de acuerdo a las cepas.
- d. Alta capacidad de retención de agua (cantidad de agua retenida por el sustrato después de ser saturado y que haya drenado toda el agua por medio de la gravedad).
- e. Ausencia de productos tóxicos (contaminación química).

La FAO (1995) menciona los procesos para la preparación del soporte:

- a. Secado.
- b. Neutralización.
- c. Molienda.
- d. Envasado.
- e. Esterilización del soporte.

2.2.1.7. Control de calidad del *Rhizobium* sp

Control del caldo de *Rhizobium* sp

Después de haber ejecutado el proceso de fermentación, el control del pH y pureza, se realiza el recuento total y de los rizobios viables. El primero se determina en la cámara de Petroff – Hausser y el número de viables se determina por el procedimiento de diluciones decimales y conteo en placas petri, usando extracto de levadura-manitol (Ayala 1982).

Control del inoculante

Los estándares mínimos varían según el país, pero oscilan con concentraciones de 10^8 y 10^9 bacterias por gramo de producto fresco. Estos son sencillos de producir usando métodos industriales, es importante que el inoculante no sea expuesto a temperaturas mayores de 30-35°C durante el transporte y almacenamiento (FAO 1995).

Verificación de la sobrevivencia de las bacterias en el soporte

La propiedad más importante de un soporte para inoculantes es su capacidad para permitir la conservación de una población suficiente de rizobios hasta la siembra (CIAT 1987). Para verificar la sobrevivencia, se realizan recuentos de bacterias viables (control de calidad) antes de la liberación al mercado, teniendo en cuenta una expiración no menor de seis meses (Labandera 1994). Se considera que 2×10^7 rizobios/gramo de inoculante son las cantidades mínimas requeridas para obtener una nodulación adecuada (CIAT 1987).

Normas mínimas para rizobios viables

Izaguirre-Mayoral *et al.* (2007) da a conocer normas mínimas para rizobios viables en países, como se muestra en la tabla 1.

Tabla 1. Normas mínimas para Rizobios en diferentes países.

País	Normas
Argentina	Requisitos mínimos de concentración de 1000 millones de UFC/g o ml ⁻¹ y de 100 millones de UFC/g o ml ⁻¹ .
Bolivia	Concentración superior a 1×10^8 cel viables/g o ml.
Perú	Concentraciones no menor a 10^8 cel/g de soporte, con una fecha de vencimiento entre 3 y 5 meses dependiendo de la cepa y del soporte.
Uruguay	Niveles de exigencia es de 2 y 1×10^9 rizobios vivos por gramo de producto para la comercialización y al vencimiento respectivamente.
Brasil	Concentración superior a 10^8 de células vírgenes de rhizobio por gramo de producto.

Fuente: Adaptado de Izaguirre-Mayoral *et al.* (2007).

2.2.1.8. Recuento de rizobios viables en medio de levadura manitol agar (LMA)

Es la técnica que se basa en contar las “unidades formadoras de colonias” o UFC presentes en un gramo de muestra. Para su desarrollo incubar a temperatura adecuada (28 °C) y para un conteo confiable se hacen diluciones decimales, antes de ponerla en el medio de cultivo (Camacho *et al.* 2009).

El recuento se realiza con la finalidad de asegurar que las células bacterianas en los inoculantes que se emplean en los ensayos de simbiosis, se hallen en número suficiente para producir una buena infección de las raíces (CIAT 1988).

2.2.1.9. Recomendaciones para hacer las diluciones según CIAT (1988).

- a. Mantener buenas condiciones de higiene empleando material estéril, mecheros, alcohol. El uso de una lámpara de luz ultravioleta durante la noche reduce la contaminación en el laboratorio.
- b. Para la siembra en cajas petri, conviene disponer de 5 a 10 rastrillos de vidrio, debidamente esterilizados.
- c. Evitar la muerte o la multiplicación de las células en cada serie de diluciones y la siembra en las cajas petri.
- d. Asegurar una dispersión homogénea de las células de rizobios, agitar bien cada muestra antes de hacer la dilución siguiente.

2.2.1.10. Procedimientos para el recuento de inoculantes según CIAT (1988).

- a. Definir las diluciones a sembrar (generalmente diluciones 10^4 a 10^8). Antes de empezar se deben marcar todos los tubos con las diluciones y las cajas petri con la fecha, el tratamiento, la repetición, y organizar el orden en que serán usados.
- b. De los inoculantes se usan tres muestras de 1 g cada una. Se agrega una muestra por tratamiento en una botella con 99 ml de dilución. Se agitan las botellas durante 10 minutos aproximadamente. Esta suspensión se denomina 10^2 .
- c. De cada suspensión 10^2 se toma 1 ml con una pipeta se diluye en 9 ml de solución obteniendo la dilución 1×10^3 .

- d. Se continúa así sucesivamente hasta obtener la dilución 10^6 (Tabla 2), luego con la misma pipeta se pasa 0.1 ml de la última dilución a la caja petri, que contiene el cultivo.
- e. Un sistema alternativo es hacer la serie de diluciones en la misma forma, pero sin pasar 0.1 ml de las diluciones a las cajas petri (Figura 5), cuando ya esté lista esa serie, se agrega con una pipeta 0.1 ml de la última dilución a una caja petri; usando la misma pipeta para distribuir las alícuotas de 0.1 ml de las otras diluciones, desde la dilución más alta hasta la más baja (concentrada).

Tabla 2. Ejemplo de obtención de diluciones para el recuento de rizobios en un inoculante sembrando diluciones de 10^4 a 10^8 , usando pipetas de vidrio de 1 ml, graduadas.

Operación	Volumen del diluyente (ml)	Dilución obtenida
Agregar: 1 g de inoculante. Agitar 10 minutos.	99	10^2
Usar la pipeta No. 1 para tomar 1 ml de la botella 10^2 , y pasarlo al tubo 10^3 agitar el tubo 10^3	9	10^3
Usar la pipeta No. 2 para tomar 1 ml del tubo 10^3 , y pasarlo al tubo 10^4 ; agitar el tubo 10^4 .	9	10^4
Usar la pipeta No. 3 para tomar 1 ml del tubo 10^4 , Y pasarlo al tubo 10^5 ; usarla además para tomar 0.1 ml de 10^4 y pasarlo a la caja petri; agitar el tubo 10^5 .	9	10^5
Usar la pipeta No. 4 para tomar del tubo 10^5 . Y pasarlo al tubo 10^5 pasarlo 10^6 , usarla además para tomar 0.1 ml de 10^5 y pasarlo a la caja petri; agitar el tubo 10^6 ;	9	10^6
Usar la pipeta No. 5 para tomar 1 ml de tubo 10^6 y pasarlo al tubo 10^7 ; usarla además para tomar 0.1 ml de 10^6 y pasarlo a la caja petri; agitar el tubo 10^7	9	10^7
Usar la pipeta No. 6 para tomar 1 ml del tubo 10^7 , Y pasarlo al tubo 10^8 ; usarla además para tomar 0.1 ml de 10^7 y pasarlo a la caja petri; agitar el tubo 10^8 .	9	10^8
Usar la pipeta No. 7 para tomar 0.1 ml de 10^8 y pasarlo a la caja petri.		

Fuente: CIAT 1988.

- f. Colocar las cajas en posición invertida, e incubarlas a temperaturas de $28\text{ }^{\circ}\text{C}$, para las cepas de crecimiento lento se hacen recuentos desde el sexto hasta el décimo día, y para las de crecimiento rápido, desde el segundo hasta el quinto día. Las colonias contadas se señalan en el fondo de la caja con un marcador de tinta indeleble. Es necesario hacer los recuentos varias veces durante la incubación,

porque las colonias que crecen rápidamente pueden unirse con el paso del tiempo, mientras otras demoran más en aparecer.

2.2.1.11. Cálculos de recuento de rizobios viables en cajas petri

Se seleccionan las cajas petri que tengan entre 30 y 300 colonias, luego se multiplica el número de colonias por la dilución y por 10, porque únicamente se puso 0.1 ml de dilución en cada caja petri. El resultado corresponde al número de células presentes en 1 gramo de inoculante.

2.2.2. Características generales de la turba

2.2.2.1. Definición

Son residuos vegetales disgregados, incompletamente descompuestos (Jaramillo 2002), saturados en agua por largos períodos de tiempo, que origina condiciones de anaerobiosis que retardan considerablemente la descomposición de los restos vegetales, que de esta manera se acumulan llegando a formar capas (Guerrero y Polo 1990), que se encuentran en el horizonte H de la nomenclatura de los suelos (Jordán 2006).

2.2.2.2. Principales usos de la turba

Se usa principalmente como fuente de materia orgánica, asegurando no solo una buena condición física, sino también aumenta considerablemente la retención del agua (Buckman 1993). Para aplicaciones agrícolas; fabricación de sustratos, acondicionar y mejorar los suelos, la utilización adecuada depende de las características de cada turba (Guerrero y Polo 1990).

También es utilizada como soporte para la producción de inoculantes, la calidad para tal uso depende de sus características y propiedades (Labandera 1982).

2.2.2.3. Propiedades de las turbas

Fernández *et al.* (1998) señala a las turbas como materiales de origen vegetal, de propiedades físicas y químicas variables en función de su origen, clasificándose en dos grupos: turbas rubias, que tienen mayor contenido de materia orgánica y están menos descompuestas y turbas negras que están más mineralizadas con menor contenido de materia orgánica.

Tabla 3. Propiedades de las turbas rubias y negras

Propiedades	Turbas rubias	Turbas negras
Densidad aparente (gr/cm ³)	0,06 - 0,1	0,3 - 0,5
Densidad real (gr/cm ³)	1,35	1,65 - 1,85
Espacio poroso (%)	94 o más	80 - 84
Capacidad de absorción de agua (gr/100 gr m.s.)	1.049	287
Aire (% volumen)	29	7,6
Agua fácilmente disponible (% volumen)	33,5	24
Agua de reserva (% volumen)	6,5	4,7
Agua difícilmente disponible (% volumen)	25,3	47,7
C.I.C. (meq/100 gr)	110 - 130	250 o más

Fuente: Fernández *et al.* (1998)

2.2.2.4. Composición química de la turba

Para Buckman (1993) la composición química de las turbas, es como sigue:

Nitrógeno y materia orgánica. Presentan cantidades de carbono-nitrógeno, además muestran generalmente una vigorosa nitrificación.

Fósforo (P) y Potasio (K). La turba contiene un bajo contenido de fósforo (0,008 hasta 0,025% en peso) y potasio, especialmente en comparación con suelo mineral.

pH. En la mayoría de las turbas, la reacción generalmente es ácida (pH de 3 a 5.5), esto se debe a la capacidad de adsorción de cationes (acidificantes), que da como resultado da una muy baja saturación de bases. Cuando se tiene valores menores que 5 es necesario neutralizar con la adición de cal.

Magnesio (Mg) y Azufre (S). El magnesio en la turba se encuentra en menor porcentaje que el de un suelo mineral. En cambio, el azufre es abundante en suelos turbosos; esto se debe generalmente a que los tejidos de las plantas contienen cantidades considerables de este elemento y por consiguiente los depósitos de turba, puede contener cifras altas.

2.2.2.5. Preparación de la turba para la producción de inoculantes

Para la producción de inoculantes se puede realizar en turba estéril o no estéril. Estar seca molida y tamizada en una malla N° 100 mm. Generalmente tiene un pH de 5.5, para ajustar a un pH neutro evaluar previamente la sobrevivencia de los rizobios en turba mezclada con diferentes niveles de cal y empacar en bolsas de polietileno de alta densidad. Se esteriliza generalmente en autoclave durante una hora diaria tres días consecutivos para una segura eliminación de hongos y bacterias. Su calidad depende del control del crecimiento de hongos que se haga mediante la refrigeración (CIAT 1988).

2.2.3. Características generales del compost

2.2.3.1. Definición

El compost es un proceso biológico, que ocurre en condiciones aeróbicas, que aprovechan el nitrógeno (N) y el carbono (C) presentes para producir su propia biomasa (Román *et al.* 2013). Se obtiene de la descomposición del estiércol, mezclado con residuos vegetales y otros ingredientes orgánicos. Los microorganismos como bacterias, hongos y lombrices descomponen los tejidos de las plantas muertas (FONCODES 2014).

2.2.3.2. Principios básicos para el compostaje

Garro (2017) señala que los principios básicos para el compostaje son:

- a. Mezcla correcta
- b. Ubicación, tamaño y forma del montículo
- c. Aireación
- d. Manejo adecuado de la humedad

Para favorecer un buen proceso de compostaje es necesario crear las condiciones ideales para la actividad microbiana, como: la cantidad adecuada de agua, oxígeno y una alimentación balanceada (Tabla 3), hay otros factores que también pueden afectar su desarrollo tales como: pH, fuentes energéticas de fácil solubilización como azúcares simples (melaza), y mayor superficie de contacto o tamaño de partícula (Soto y Muñoz 2002).

También se debe tener en cuenta el tiempo de proceso, requisitos de espacio, seguridad higiénica requerida, material de partida (ausencia o presencia de material de origen animal), condiciones climáticas del lugar (temperaturas bajo cero, vientos fuertes, lluvias torrenciales u otros eventos climáticos extremos) (Román *et al.* 2013).

Tabla 4. Condiciones ideales de compostaje.

Condición	Ámbito aceptable	Condición óptima
Relación C:N	20:1 – 40:1	25:1 – 30:1
Humedad	40 – 65%	50 – 60 %
Oxígeno	5%	8%
pH	5,5 – 9,0	6,5 – 8,0
Temperatura °C	55 – 75	65 – 70°C
Tamaño de partícula	0,5 – 1,0	variable

Fuente Rynk (1992).

2.2.3.3. Ventajas del compost

FONCODES (2014), hace mención a las principales ventajas del compost:

- a. Mejora la producción de los cultivos, aumentando su resistencia al ataque de las plagas, enfermedades, heladas y eventos extremos del clima.
- b. Facilita la absorción de los nutrientes y el agua por la planta.
- c. Mejora la estructura del suelo.
- d. No contamina el suelo, el ambiente, porque se reciclan los desechos orgánicos.
- e. Permite utilizar insumos que se encuentran en la chacra.

2.2.3.4. Fases del compostaje

En este proceso los microorganismos generan calor y un sustrato sólido, con menos C y N, más estable llamado compost (Román *et al.* 2013). Según la temperatura generada durante el proceso, se reconocen tres etapas principales, además de una etapa de maduración de duración variable. Las diferentes fases del compostaje se dividen según la temperatura, en:

Fase Mesófila. comienza a temperatura ambiente y en pocos días (e incluso en horas), aumenta hasta los 45°C. el pH puede bajar (hasta cerca de 4.0 o 4.5). Esta fase dura pocos días (entre dos y ocho días).

Fase Termófila o de Higienización. Cuando el material alcanza los 45°C, los microorganismos que se desarrollan a temperaturas medias (microorganismos mesófilos) son reemplazados por aquellos que crecen a mayores temperaturas.

Fase de Enfriamiento o Mesófila II. Agotadas las fuentes de carbono y, en especial el nitrógeno en el material de compostaje, la temperatura desciende nuevamente hasta los 40-45°C, continúa la degradación de polímeros como la celulosa, y aparecen algunos hongos visibles a simple vista. Al bajar de 40 °C los organismos mesófilos reinician su actividad y el pH del medio desciende levemente, aunque en general el pH se mantiene ligeramente alcalino.

Fase de Maduración. Las tres primeras fases duran unas semanas, pero este periodo requiere de meses a temperatura ambiente (3 y 9 meses), durante los cuales se producen reacciones secundarias de condensación y polimerización de compuestos carbonados para la formación de ácidos húmicos y fúlvicos. La temperatura debe disminuir hasta valores cercanos a los ambientales y el pH se estabilizará próximo a la neutralidad.

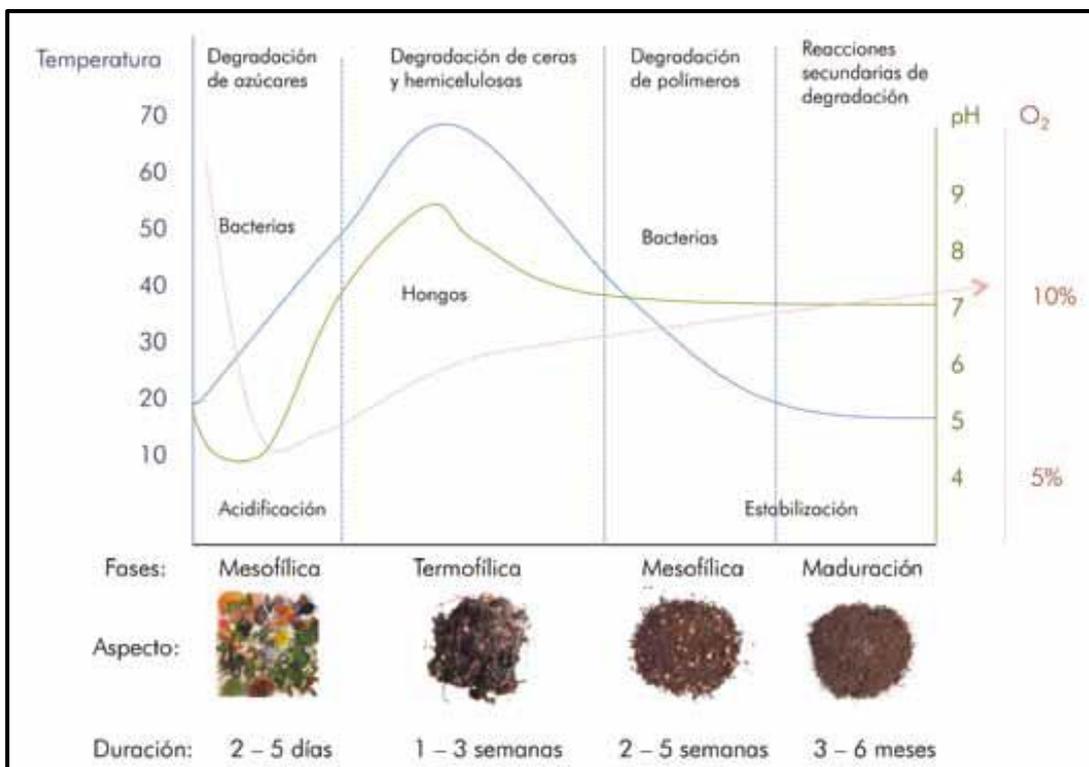


Figura 1. Temperatura, oxígeno y pH en el proceso de compostaje según Román *et al.* (2013).

2.2.3.5. Parámetros de seguimiento del compost

Los parámetros que afectan su crecimiento y reproducción, son el oxígeno o aireación, la humedad de substrato, temperatura, pH y la relación C:N. Externamente, el proceso depende en gran medida de las condiciones ambientales, el método utilizado, las materias primas empleadas, y otros elementos, por lo que algunos parámetros pueden variar (Román *et al.* 2013), a continuación se señalan los parámetros y sus rangos óptimos:

Oxígeno. Una aireación adecuada permite la respiración de los microorganismos. La cantidad de oxígeno varían durante el proceso (Figura 1) alcanzando la mayor tasa de consumo durante la fase termofílica.

Dióxido de Carbono (CO₂). El CO₂ se libera por acción de la respiración de los microorganismos, pueden generarse 2 a 3 kilos por cada tonelada, diariamente. El CO₂ producido durante el proceso de compostaje, en general es considerado de bajo impacto ambiental, por cuanto es capturado por plantas para realizar fotosíntesis.

Humedad. La humedad óptima para el compost se sitúa alrededor del 55%, aunque varía dependiendo del estado físico y tamaño de las partículas, así como del sistema empleado para realizar el compostaje.

pH. Depende de los materiales de origen y varía en cada fase del proceso (desde 4.5 a 8.5). En los primeros estudios del proceso, el pH se acidifica por la formación de ácidos orgánicos. En la fase termófila, debido a la conversión del amonio en amoníaco, el pH sube y se alcaliniza el medio, para finalmente estabilizarse en valores cercanos al neutro.

Relación Carbono-Nitrógeno (C:N). La relación C:N varía en función del material de partida y se obtiene la relación numérica al dividir el contenido de C (% C total) sobre el contenido de N total (% N total) de los materiales a compostar. Esta relación también varía a lo largo del proceso, desde 35:1 a 15:1.

Tamaño de partícula. La actividad microbiana está relacionada con el tamaño de la partícula, el tamaño ideal de los materiales para comenzar el compostaje es de 5 a 20 cm.

Tabla 5. Parámetros del compostaje

Parámetro	Rango ideal al comienzo (2-5 días)	Rango ideal para compost en fase termofílica II (2-5 semanas)	Rango ideal de compost maduro (3-6 meses)
C:N	25:1 – 35:1	15/20	10:1 – 15:1
Humedad	50% - 60%	45%-55%	30% - 40%
Concentración de Oxígeno	~10%	~10%	~10%
Tamaño de partícula	<25 cm	~15 cm	<1,6 cm
pH	6,5 – 8,0	6,0-8,5	6,5 – 8,5
Temperatura	45 – 60°C	45°C-Temperatura ambiente	Temperatura ambiente
Densidad	250-400 kg/m ³	<700 kg/m ³	<700 kg/m ³
Materia orgánica (Base seca)	50%-70%	>20%	>20%
Nitrógeno Total (Base seca)	2,5-3%	1-2%	~1%

Fuente: Román *et al.* (2013)

2.2.3.6. Aplicación del compost

Se puede aplicar semimaduro o ya maduro, se recomienda el uso de compost semimaduro, ya que tiene una elevada actividad biológica y un porcentaje de nutrientes fácilmente asimilables por las plantas en comparación con el compost maduro (Román *et al.*2013).

Por otra parte, FONCODES (2014) menciona que se puede utilizar en todos los cultivos, de preferencia en la siembra, durante el aporque y en el deshierbe. También se recomienda usar en la preparación del sustrato de los almácigos.

2.2.4. Características generales del estiércol de lombriz

2.2.4.1. Definición.

Es el resultado de la digestión de materia orgánica (compost, estiércol descompuesto, vegetales) por las lombrices, obteniéndose uno de los abonos orgánicos de mejor calidad (FONCODES 2014). Las materias orgánicas son transformadas por esta especie mediante su ingesta y excreta, en un compost rico en nutrientes y en

microorganismos, condiciones que hacen asimilables para las plantas elementos minerales como fósforo, calcio, potasio, magnesio y los microelementos (Garro 2017).

2.2.4.2. Características.

Las principales características del estiércol de lombriz que Garro (2017) nos presenta son:

- a. Es un material de color oscuro, con un agradable olor a mantillo del bosque.
- b. Aporta una alta carga microbiana benéfica.
- c. Este producto posee una alta solubilidad y carga enzimática-bacteriana, características que lo hacen rápidamente asimilable por las raíces de las plantas y le da características de supresor de bacterias, hongos y nematodos fitopatógenos.
- d. Su acción antibiótica aumenta la resistencia de las plantas a las plagas y agentes patógenos.
- e. Este abono por lo general incrementa la concentración de nutrientes, P, Ca, Mg, K, la CIC, la acidez intercambiable y el pH del suelo
- f. Es limpio, suave al tacto y su gran bio-estabilidad evita su fermentación o putrefacción.
- g. Mejora la retención de humedad y de los elementos nutritivos.
- h. Influye de forma efectiva en la germinación de las semillas y en el desarrollo de las plántulas.
- i. Aporta y contribuye al mantenimiento y al desarrollo de la micro flora y micro fauna del suelo.
- j. Aporta sustancias húmicas.
- k. Mejoran la infiltración del agua y la aireación del suelo.
- l. Mejora y regenera los suelos.

2.2.4.3. Usos del estiércol de lombriz

Generalmente se usa en la producción de los cultivos, ya que aporta nutrientes al suelo (nitrógeno, fósforo y potasio), mejora su calidad física, química y biológica (FONCODES 2014).

NOSTOC (2018) menciona que el humus de lombriz elimina las propiedades no deseadas del estiércol, ya que evita fermentaciones. En él encontramos una microflora que es benéfica para los suelos y las plantas que no lo podemos encontrar en ningún abono similar.

2.2.4.4. Ventajas del estiércol de lombriz

NOSTOC (2018) y FONCODES (2014) nos señalan las principales ventajas del estiércol de lombriz:

- a. En condiciones óptimas de producción aporta más nitrógeno, fósforo y potasio que otros abonos orgánicos, una parte de los nutrientes son absorbidos por los cultivos y otra parte se queda como reserva en el suelo.
- b. Aumenta entre 5 a 30% la capacidad de retención del agua en el suelo.
- c. Por su color oscuro contribuye a la absorción de calor por el suelo y neutraliza los contaminantes, como los insecticidas. Es un abono con un pH prácticamente neutro que varía entre 6,8 y 7,8.
- d. Contiene abundante flora bacteriana (miles de millones de colonias por gramo de producto).
- e. Hace que los suelos presenten una mejor estructura ya que actúa uniendo las partículas del suelo haciendo que las estructuras granulares sean las adecuadas para favorecer un desarrollo radicular óptimo.
- f. Mejora el intercambio gaseoso.
- g. Activa los microorganismos presentes en el suelo
- h. Produce una oxidación rápida de la materia orgánica haciendo que los nutrientes estén disponibles para las plantas en el suelo.

CAPÍTULO III

MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Ubicación del estudio

El presente trabajo de investigación fue ejecutado, en el Laboratorio de Rhizobiología, ambiente 2C-101 y en los invernaderos de la Facultad de Ciencias Agrarias de la Universidad Nacional de Cajamarca (distrito, provincia, y departamento de Cajamarca). Institución ubicada en la ciudad de Cajamarca con coordenadas UTM: 776710 y 9206889, y a 2682 msnm.

3.2. Materiales

3.2.1. Material experimental

a) Inoculante

Se manipuló la cepa de *Rhizobium meliloti*, proporcionada por el Laboratorio de Rhizobiología de la Facultad de Ciencias Agrarias de la Universidad Nacional de Cajamarca.

b) Turba

Material recolectado del kilometro 35 de la carretera que conduce de la ciudad de Cajamarca – a la Granja Porcón a una Altitud de 3800 msnm, al este de la ciudad de Cajamarca.

c) Estiércol de lombriz

Muestra obtenida del fundo Huacariz ubicada en el kilometro 07 de la carretera que conduce de la ciudad de Cajamarca – al distrito de Jesús, provincia de Cajamarca.

d) Compost

Se tomó la muestra del sector denominado “el Chapulín”, ubicada a 0.7 km de la ciudad Cajamarca. Para luego realizar su análisis químico en el Laboratorio de Análisis de Suelos y Plantas, Aguas y Fertilizantes de la Facultad de Agronomía de la Universidad Nacional Agraria la Molina (Tabla 9).

3.2.2. Materiales y equipos de laboratorio

a. Materiales de campo

Libreta de registro de campo.

Picos

Palanas

Bolsas de polietileno

b. Compuestos y medio de cultivo

Extracto de levadura

Agua destilada

Lejía (NaClO)

Agar (C₁₂H₁₈O₉)

Manitol (C₆H₁₄O₆)

Alcohol de 96%

c. Reactivos

K₂HPO₄ (Fosfato de potasio dibásico)

KH₂PO₄ (Fosfato de potasio monobásico)

MgSO₄·7H₂O (Sulfato de magnesio hidratado)

CaCl₂·2H₂O (Cloruro de calcio)

KNO₃ (Nitrato de potasio)

FeSO₄·7H₂O (Sulfato de hierro hidratado)

NaCl (Cloruro de sodio)

FeCl₃·6H₂O (Cloruro de hierro hidratado)

Na₂MO₄·2H₂O (Molibdato de sodio)

C₃₂H₂₂N₆Na₂O₆S₂ (Rojo congo)

C₂₄H₂₈N₃Cl (Cristal violeta)

C₂H₈N₂O₄ (Oxalato de amonio)

C₂H₅OH (Etanol)

I₂ (Yodo)

KI (Yoduro de potasio)

C₂₀H₁₉N₄⁺Cl⁻ (Safranina)

d. Material de vidrio

Vasos

Pipetas

Matraz

Erlenmeyer

Probetas

Tubos de ensayo con tapa rosca

Placas petri

Láminas porta objetos

Láminas cubre objetos

e. Equipos

Estufa

Autoclave

Microscopio

Cocina eléctrica

Balanza analítica

Molino

Tamices

Mechero bunsen

Cámara fotográfica

GPS

3.2.3. Otros materiales

Material de escritorio

Papel aluminio

Algodón

Bolsas de polietileno

Cinta adhesiva

3.3. Metodología

3.3.1. Trabajo en campo

a) Obtención del sustrato: turba

Material obtenido de la Granja Porcón a una Altitud de 3800 msnm, al este de la ciudad de Cajamarca, a 35 km de distancia. El análisis químico se realizó en el Laboratorio de Análisis de Suelos y Plantas, Aguas y Fertilizantes de la Facultad de Agronomía de la Universidad Nacional Agraria la Molina (Tabla 6).

Luego se acarrió el sustrato, eliminando materiales extraños que contenía, para posteriormente ser trasladado al laboratorio de Rhizobiología, para la preparación correspondiente.

Tabla 6. Análisis físico químico de la turba

Lugar de recolección	Determinaciones	Unidad	Resultado
PORCON	pH		5,26
	C.E.	dS/m	0,56
	M.O.	%	25,08
	N	%	0,75
	P ₂ O ₅	%	0,21
	K ₂ O	%	0,04
	CaO	%	0,25
	MgO	%	0,38
	Hd	%	9,34
	Na	%	0,20

Fuente: Laboratorio de Análisis de Suelos y Plantas, Aguas y Fertilizantes de la Facultad de Agronomía de la Universidad Nacional Agraria la Molina.

b) Obtención del sustrato: estiércol de lombriz

Se obtuvo la muestra del fundo denominado Huacariz en el Km 07 de la carretera al distrito de Jesús, provincia de Cajamarca, procediéndose el traslado del sustrato al laboratorio de Rhizobiología de la Universidad Nacional de Cajamarca. Para luego realizar el análisis físico químico en el laboratorio de Análisis de Suelos y Plantas, Aguas y Fertilizantes de la Facultad de Agronomía de la Universidad Nacional Agraria la Molina, los resultados obtenidos son los siguientes:

Tabla 7. Resultado de análisis físico químico de muestras del estiércol de lombriz

Determinaciones	Unidad	Resultados
pH		6,91
C.E.	dS/m	13,70
M.O.	%	38,28
N	%	1,73
P2O5	%	2,51
K2O	%	1,56
CaO	%	7,63
MgO	%	0,88
Hd	%	45,31
Na	%	0,41

Fuente: Laboratorio de Análisis de Suelos y Plantas, Aguas y Fertilizantes de la Facultad de Agronomía de la Universidad Nacional Agraria la Molina.

c) Obtención del sustrato: compost

Se tomó la muestra del sector denominado “el chapulín”, ubicada a 0.7 km de la ciudad Cajamarca. Y se procedió el traslado del sustrato al laboratorio de Rhizobiología de la Universidad Nacional de Cajamarca, para su respectiva preparación.

El análisis químico se realizó en el Laboratorio de Análisis de Suelos y Plantas, Aguas y Fertilizantes de la Facultad de Agronomía de la Universidad Nacional Agraria la Molina.

Tabla 8. Resultado de análisis físico químico del compost

Determinaciones	Unidad	resultado
pH		6,74
C.E.	dS/m	9,59
M.O.	%	32,52
N	%	1,54
P2O5	%	1,13
K2O	%	1,56
CaO	%	3,33
MgO	%	0,53
Hd	%	46,57
Na	%	0,26

Fuente: Laboratorio de Análisis de Suelos y Plantas, Aguas y Fertilizantes de la Facultad de Agronomía de la Universidad Nacional Agraria la Molina.

3.3.2. Trabajo de laboratorio

3.3.2.1. Preparación de los sustratos

Preparación del sustrato turba

Para la preparación de la turba se realizó de la siguiente manera:

- a. Una vez seleccionada la turba se depositó en las instalaciones del laboratorio de Rhizobiología.
- b. Luego se procedió al secado del sustrato, a temperatura ambiente y se depositó en un ambiente adecuado.
- c. Se procedió al molido de la turba seca.
- d. Una vez molida la turba, se tamizó a través de una malla de 100 mm de diámetro.
- e. Se neutralizó la turba con carbonato de calcio (CaCO_3), en 02%.
- f. Luego se procedió al pesaje del sustrato (150 g) y el envasado en bolsas de polietileno y sellado con la máquina selladora de plástico.
- g. Finalmente, se esterilizó en autoclave, a una temperatura de 127 °C y una presión de 1.5 atmósferas durante una hora diaria efectiva por 03 días consecutivos (las bolsas de polietileno no resisten a altas temperaturas durante horas seguidas).
- h. Esquemáticamente la preparación de los sustratos (turba, estiércol de lombriz y compost), se aprecia en la figura 2.

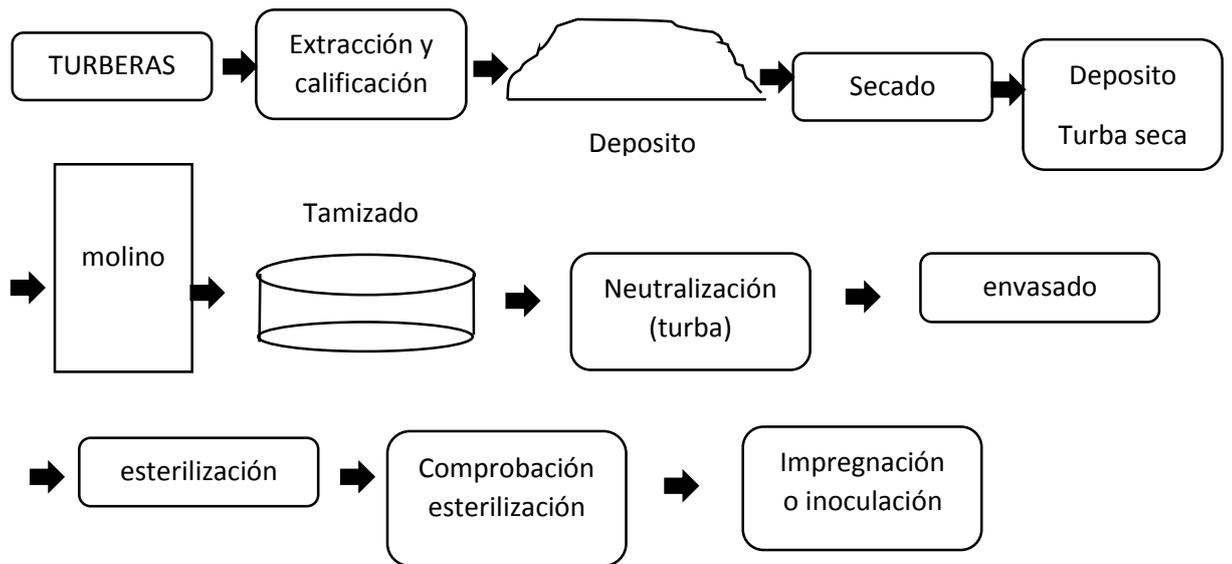


Figura 2. Procesos para la preparación de los sustratos a base de turba, estiércol de lombriz y compost.

Preparación del sustrato de estiércol de lombriz

Para la preparación de este sustrato se siguió el siguiente procedimiento:

- a. Se seleccionó al sustrato, eliminando los materiales extraños, para proceder al secado a temperatura ambiente.
- b. Posteriormente se trituro en un molino.
- c. Una vez molido se procedió al tamizado en una malla de 100 mm de diámetro.
- d. El pH del estiércol de lombriz de acuerdo a los análisis realizados es óptimo (Figura 11), por lo tanto no se realiza la neutralización.
- e. Luego se pesó 150 g de sustrato, para ser envasado en bolsas de polietileno de 250 gramos de capacidad y sellado con la maquina selladora de plástico.
- f. Finalmente, se esterilizó en autoclave, a una temperatura de 127°C y una presión de 1.5 atmosferas durante una hora diaria por 03 días consecutivos.

Preparación del sustrato de compost

Una vez obtenido el sustrato en el laboratorio se procedió de la siguiente forma para la preparación:

- a. Se seleccionó al sustrato, eliminando los materiales extraños, para proceder al secado a temperatura ambiente.
- b. Posteriormente se trituro en un molino.
- c. Una vez molido se procedió al tamizado del sustrato en una malla de 100 mm de diámetro.
- d. Luego se pesó 150 g de sustrato, para ser envasado en bolsas de polietileno de 250 gramos de capacidad y sellado con la maquina selladora de plástico.
- e. Finalmente, se esterilizó en autoclave, a una temperatura de 127 °C y una presión de 1.5 atmosferas durante una hora diaria por 03 días consecutivos.

3.3.2.2. Comprobación de la esterilización

La comprobación de la esterilización, se realizó con la finalidad de determinar la existencia de microorganismos contaminantes, y se siguió los siguientes pasos:

- a. De los 03 tratamientos esterilizados, se tomaron una muestra de cada uno al azar (T_1 = turba, T_2 = estiércol de lombriz y T_3 = compost).
- b. Se pesó 10 gramos de cada muestra.
- c. Se depositó en un matraz con 90 ml de agua destilada estéril, luego se agregó 10 gramos del soporte (muestra). Obteniéndose así la primera dilución 10^{-1} .
- d. Se tomó tres tubos de ensayo con tapa con rosca por cada muestra, con 09 ml de agua destilada estéril cada uno.
- e. De la primera dilución se tomó con la ayuda de una pipeta estéril, 1 ml de suspensión y se depositó en el primer tubo, el cual contiene 9 ml de agua estéril, agitándose adecuadamente para obtener una buena mezcla.
- f. Del primer tubo de prueba se extrajo 1 ml de suspensión y se depositó en el segundo tubo, agitándose como es el caso anterior.
- g. Del segundo tubo nuevamente se tomó 1 ml y se agregó en el tercer tubo, obteniéndose así las siguientes diluciones: 1:10, 1:100 y 1:1000.

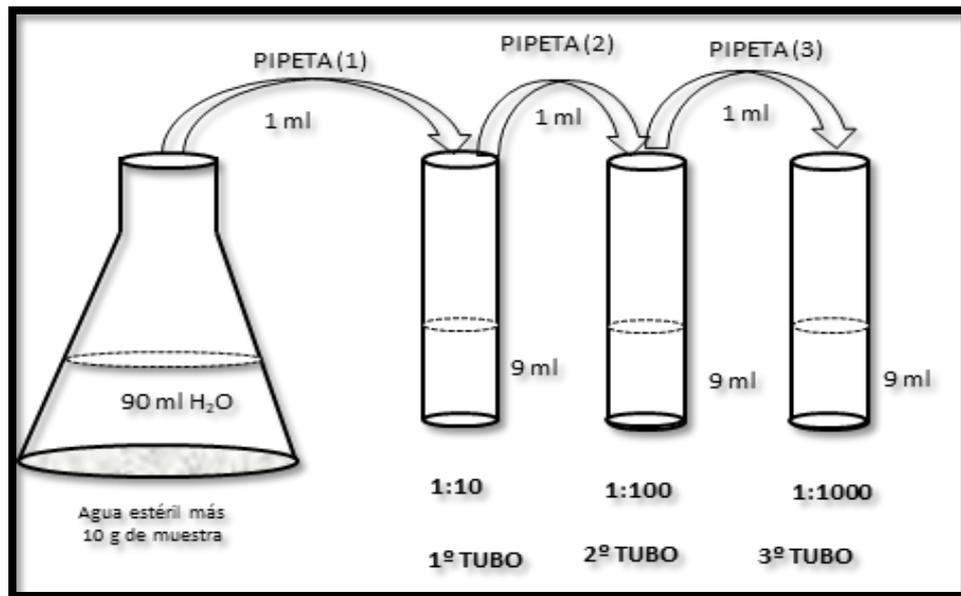


Figura 3. Diluciones del sustrato

- h. Del segundo tubo y tercer tubo, se extrajo 1 ml de suspensión, se sembró en las placas con medio de LMA, previamente esterilizadas.
- i. Las placas sembradas con suspensión (paso anterior), se incubaron en una estufa a 28°C.
- j. Después de las 24, 48, 72 y 96 horas de incubadas, se realizaron las evaluaciones aleatorias, para a determinar la presencia o no de contaminantes.

Tabla 9. Contaje de colonias contaminantes en los sustratos esterilizados por 1 hora diaria durante 3 días consecutivos, después de 96 horas.

Tratamientos	Dilución 1:100 (Número de colonias)	Dilución 1:1000 (Número de colonias)
T ₁	00	00
T ₂	05	02
T ₃	00	00

- k. Se determinó en el tratamiento (T₂), correspondiente al sustrato estiércol de lombriz, la presencia de contaminantes, por lo que se procedió a esterilizar este tratamiento por 1 hora más sumando 4 horas consecutivos por 4 días.
- l. Una vez realizado la esterilización se efectuó el procedimiento anterior, determinándose que no existe crecimiento de ninguna colonia.

Tabla 10. Contaje de colonias contaminantes del sustrato T₂ esterilizados por 1 hora diaria durante 4 días consecutivos.

Tratamientos	Dilución 1:100 (número de colonias)	Dilución 1:1000 (número de colonias)
T ₂	00	00

3.3.2.3. Preparación del medio de cultivo (caldo nutritivo) de *Rhizobium meliloti*

Para 1 litro de medio de cultivo se realizó el siguiente procedimiento:

- a. En un matraz se agregó las siguientes soluciones madres:
 - 1 ml de KHPO₄
 - 10 ml de MgSO₄ H₂O
 - 10 ml de CaCl₂
 - 10 ml de KNO₃
 - 1 ml de FeCl₃. 6H₂O
 - 1 ml de FeSO₄.7H₂O
 - 1 ml de Na₂MO₄.2H₂O
 - 1 ml de EDTA
- b. Luego se agregó 10 gramos de manitol, 5 gramos de lactosa y 10 gramos de peptona.
- c. Se procedió a homogenizar, haciendo uso del agitador magnético por cinco minutos.
- d. Se completó con agua destilada hasta 1000 ml.
- e. Posteriormente se corrigió el pH en una escala de 5.7 a 5.8 (escala optima para este cultivo) con HCl.
- f. Se esterilizó en autoclave a 1 atmosfera de presion y 121°C de temperatura durante 15 minutos.

3.3.2.4. Contaje del número de bacterias a partir del medio líquido

Para determinar el número de bacterias desarrolladas en el medio de cultivo, se procedió de la forma siguiente:

- Del cultivo puro de *R. meliloti*, se tomó 01 ml de este medio, con la ayuda de una pipeta graduada y se incorporó al tubo de ensayo que contiene 09 ml de una solución salina estéril al 0.85 % (así se tiene una dilución 1:10). Para una adecuada mezcla, se agitó (rotó) la solución varias veces.
- Luego se preparó una dilución 1:100, tomándose 01 ml de la dilución 1:10, y se incorporó al tercer tubo de ensayo, que también contiene 09 ml de la solución salina, y así sucesivamente tal como se aprecia en la Figura 4.

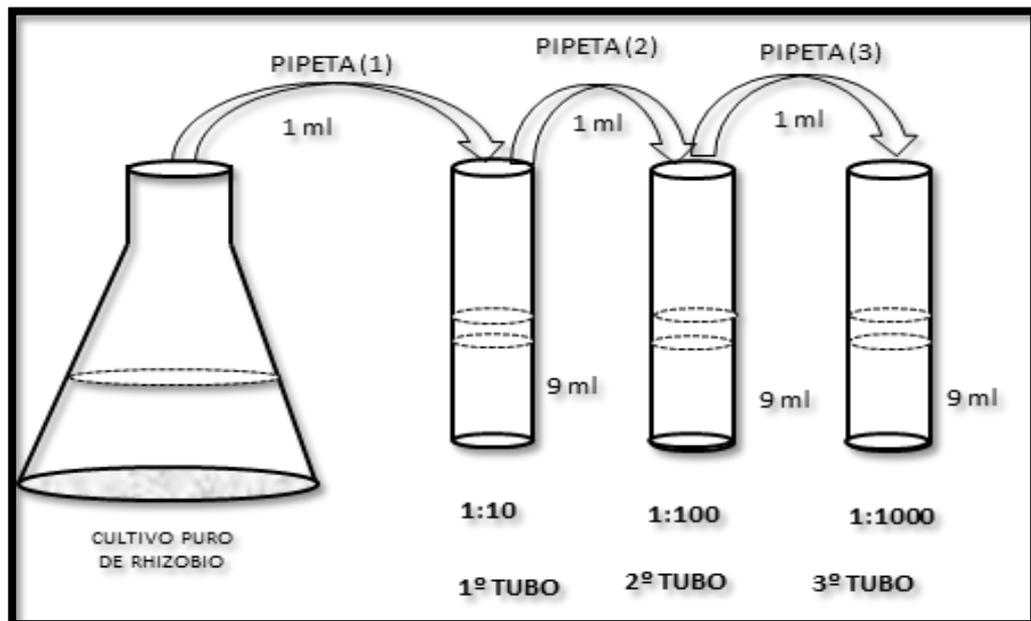


Figura 4. Dilución del medio del *Rhizobium* para el contaje del número de bacterias por mililitro.

- Luego de la dilución del medio de cultivo de *R. meliloti*, se procedió al contaje del número de bacterias por ml de medio de cultivo, siguiendo los siguientes pasos;
- Se lavó la cámara y el cubreobjetos con agua destilada y alcohol 96%, se seco y se colocó el cubreobjetos encima de la cámara.
- Luego con la ayuda de una micropipeta se depositó una gota con la dilución escogida (1:1000).

- f. Se fijó la cámara de recuento en la platina del microscopio para realizar la observación, centrando el objetivo del microscopio en el centro teórico de la cruz de la cámara, determinando el aumento adecuado y obteniendo una imagen clara y nítida.
- g. El número de bacterias/ml se determinó utilizando la siguiente ecuación:

$$\text{N}^{\circ} \text{ de bacterias/ml} = \frac{\text{N}^{\circ} \text{ de Bacterias Contadas}}{5} \times (0.2\text{mm})^2 \times 0.1\text{mm} \times \text{Dilucion} \times 400$$

Finalmente se determinó que existe una carga bacterial de 8.2×10^7 bacterias/ml del medio de cultivo, número adecuado para realizar la impregnación.

3.3.2.5. Inoculación o impregnación de los sustratos

Una vez que los sustratos (turba, estiércol de lombriz y compost) se esterilizó, se procedió a impregnarlos con el cultivo de la bacteria de *R. meliloti*, preparado previamente en el laboratorio de rizobiología.

Se impregnó 50 ml de cultivo líquido de bacterias de *R. meliloti*, por cada bolsa de 150 gramos de sustrato; con la ayuda de una aguja hipodérmica.

Luego de la impregnación, se procedió a sellar el orificio dejado por la aguja y a su respectiva identificación (de acuerdo a los tratamientos planteados en la investigación).

3.3.2.6. Incubación de los sustratos inoculados

Luego de la impregnación del medio líquido de *R. meliloti*, a los diferentes tratamientos en estudio se homogenizó, luego se incubaron en una estufa a 28°C por 5 días, después de este periodo, los tratamientos fueron depositados en un ambiente del laboratorio, a temperatura ambiente promedio de 20.5°C y 45.5 % de humedad relativa, e iniciar con las evaluaciones durante los 4 meses consecutivos.

3.3.2.7. Contaje del número de bacterias por gramo de inoculante

Para el contaje del número de bacterias se realizó con el método de recuento de bacterias viables en placas petri, siguiendo los siguientes pasos:

- a. Se definió las diluciones a sembrar (10^6 , 10^7 y 10^8), se marcó todos los tubos de las diluciones y las cajas petri con la fecha, el tratamiento, y la repetición, y se organizan de acuerdo al orden que serán usados.
- b. Para las diluciones se prepara una solución salina al 0.85%.
- c. Del inoculante se toma 10 gramos y se agregó a un matraz que contiene 90 ml de solución salina, agitándose durante 10 minutos, la dilución obtenida será 10^1 .
- d. De la suspensión 10^1 se toma 1 ml con una pipeta de vidrio de 1 ml de capacidad y se diluye en 9 ml de solución diluyente; se obtiene así una dilución de 1×10^2 .
- e. Se sigue el mismo procedimiento hasta llegar a las diluciones de 1×10^8 .
- f. Desde la dilución 1×10^6 , se agrega con la misma pipeta que se utilizó para la dilución siguiente, 0.1 ml sobre la superficie de una caja petri que contiene el medio de levadura-manitol-agar (LMA), distribuyendo bien esas gotas con un rastrillo esterilizado previamente con alcohol y flameado. Este procedimiento se aplica en las siguientes diluciones (1×10^7 y 1×10^8).
- g. Una vez realizado la inoculación, las placas son incubadas en posición invertidas a temperatura de 28 °C.
- h. Luego se procede al contaje de las bacterias desde el segundo hasta el quinto día. Las colonias contadas se señalan en el fondo de la caja con un marcador de tinta indeleble.

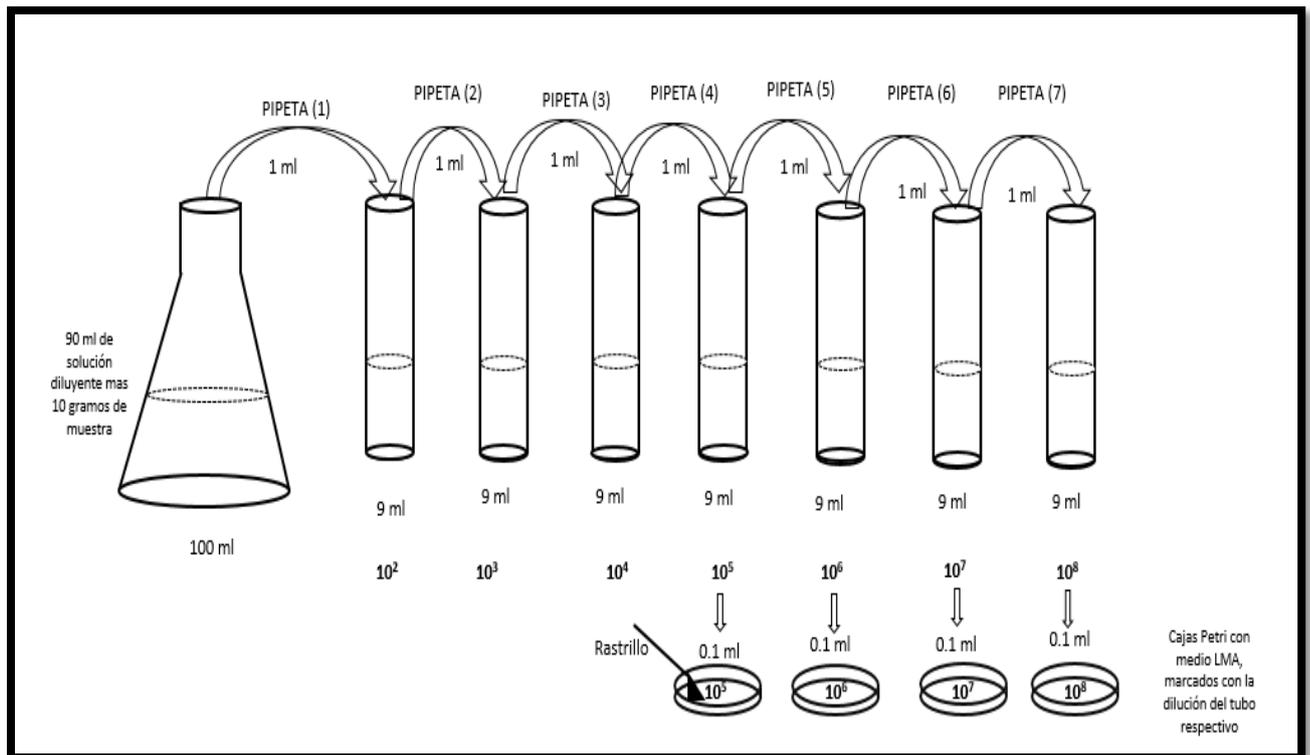


Figura 5. Esquema de las diluciones y de la siembra, en un recuento de células de rizobios en cajas petri.

3.3.2.8. Cálculos

- Para cada serie de diluciones, se escogen las cajas petri que tengan entre 30 y 300 colonias.
- Se multiplica el número de colonias por la dilución, y luego por 10 porque únicamente se puso 1 ml de la dilución en cada una de las cajas petri.
- Este resultado corresponde al número de células presentes en 1 gramo de inoculante.
- Este cálculo se hace para cada repetición, y después se determinó el promedio y la varianza de los datos obtenidos.

$$\text{N}^{\circ} \text{ de células en } 1\text{g} = \frac{\text{N}^{\circ} \text{ de colonias} \times \text{dilución} \times 10}{1\text{g}}$$

3.3.2.9. Factores, niveles y combinaciones en estudio

Factor A: sustrato

a_1 = turba

a_2 = estiércol de lombriz

a_3 = compost

Factor B: Tiempo (Días)

b_1 = 30 días después de la inoculación o impregnación del cultivo (medio líquido) a los sustratos.

b_2 = 60 días después de la inoculación o impregnación del cultivo (medio líquido) a los sustratos.

b_3 = 90 días después de la inoculación o impregnación del cultivo (medio líquido) a los sustratos.

b_4 = 120 días después de la inoculación o impregnación del cultivo (medio líquido) a los sustratos.

Tabla 11. Factores, niveles y combinaciones de tratamientos

Clases de la Combinación		Factor A: tipo de sustrato	Factor B: Tiempo (Días)
Numérico	Alfabético		
1	a ₁ b ₁	turba	30
2	a ₁ b ₂	turba	60
3	a ₁ b ₃	turba	90
4	a ₁ b ₄	turba	120
5	a ₂ b ₁	estiércol de lombriz	30
6	a ₂ b ₂	estiércol de lombriz	60
7	a ₂ b ₃	estiércol de lombriz	90
8	a ₂ b ₄	estiércol de lombriz	120
9	a ₃ b ₁	compost	30
10	a ₃ b ₂	compost	60
11	a ₃ b ₃	compost	90
12	a ₃ b ₄	compost	120

3.3.2.10. Diseño experimental

Se empleó el diseño completamente randomizado, con arreglo factorial de 3 x 4 y cuatro (04) repeticiones por tratamiento.

3.3.2.11. Evaluaciones realizadas

La supervivencia de las bacterias contenidas en cada sustrato, se realizó con el método; recuento de rizobios viables en cajas petri (ver figura 5), a través de la siguiente formula:

$$\text{N}^{\circ} \text{ de células en } 1\text{g} = \frac{\text{N}^{\circ} \text{ de colonias} \times \text{dilución} \times 10}{1\text{g}}$$

Determinándose la supervivencia del N° de *R. meliloti*/gramo de sustrato en cada uno de los tratamientos desde los 30 días después de la inoculación hasta los 120 días, comparando los resultados con las normas internacionales de rizobios viables en soportes (sustratos).

3.3.3. Trabajo de gabinete

Para esta fase se efectuó el análisis de los datos obtenidos durante el trabajo de laboratorio. Siendo sometidos a un Análisis de Varianza (ANVA) de acuerdo al procedimiento establecido para el Diseño Completamente Randomizado con arreglo factorial 3 x 4 con un nivel de significación de 0.05. El esquema del análisis de variancia para este modelo, Tabla 12.

Tabla 12. Análisis de variancia del DCR con arreglo factorial 3 x 4, prueba de F para la capacidad de sobrevivencia de N° bacterias/ gramo de sustrato de *Rhizobium meliloti*.

Fuente de variación	SC	GL	CM	Fo
Sustrato	Ayy	2	M1	M1/M4
Días	Cyy	3	M2	M2/M4
Sustrato x Días	TxCyy	6	M3	M3/M4
Error	Eyy	36	M4	
Total	Gyy	47		

La significación de los cuadrados medios correspondiente a tipo de sustrato, tiempo (días) después de la inoculación o impregnación y la interacción de ambos factores son probados por el cuadrado medio del error, como se especifica en la prueba de F. Este análisis nos permite estudiar las siguientes hipótesis:

Prueba de hipótesis para la interacción

Ho: No existe interacción entre el factor sustrato y el tiempo (días) en la sobrevivencia o viabilidad del *R. meliloti*.

Hi: Existe interacción entre el factor sustrato y el tiempo (días) en la sobrevivencia o viabilidad del *R. meliloti*.

La prueba de F para la interacción $F_o = M3/M4$, se aprecia su significación cuando comparamos alfa con valor p. Si valor p es menor que alfa 0.05 es significativo y se rechaza Ho y se concluye que existe interacción (tipo de sustrato por días después de la impregnación del inoculante de *R. meliloti*).

Prueba de hipótesis para el tipo de sustrato

Ho: No hay diferencias significativas para cada tipo de sustrato en la supervivencia del *R. meliloti*.

Hi: Si hay diferencias significativas para cada tipo de sustrato en la supervivencia del *R. meliloti*.

La prueba de F para la interacción $F_o = M1/M4$, se aprecia su significación cuando comparamos alfa con valor p. Si valor p es menor que alfa 0.05 es significativo y se rechaza Ho y se concluye que existen diferencias significativas, en la sobrevivencia del *R. meliloti* para cada tipo de sustrato.

Prueba de hipótesis para el tiempo (días) después de la impregnación

Ho: No hay diferencia significativa en la supervivencia de *R. meliloti* para los diferentes tiempos de evaluación (30, 60, 90 y 120 días).

Hi: Si hay diferencia significativa en la supervivencia de *R. meliloti* para los diferentes tiempos de evaluación (30, 60, 90 y 120 días).

La prueba de F para la interacción $F_o = M2/M4$, se aprecia su significación cuando comparamos alfa con valor p. Si valor p es menor que alfa 0.05 es significativo y se rechaza Ho y se concluye que existen diferencias significativas en la supervivencia de *R. meliloti* (N° bacterias/gramo) para los diferentes tiempos de evaluación (30, 60, 90 y 120 días).

Para conocer la supervivencia en cada uno de los sustratos por el tiempo (30, 60, 90 y 120 días) que duró el estudio, se utilizó la Prueba de Rango Múltiple de Duncan. Así como también para determinar la viabilidad de supervivencia del *R. meliloti* al cabo de los 120 días después de la inoculación o impregnación del medio líquido en los sustratos.

Para estudiar la relación entre las variables de estudio se utilizó un análisis de regresión. Se consideraron modelos de regresión lineal y regresión cuadrática. Como medida de ajuste de los modelos se consideró el coeficiente de determinación o R^2 (indica la cantidad de variabilidad explicada por el modelo), el cual toma valores de 0 a 1 (0 cuando las variables son independientes y 1 cuando existe una relación entre ellas). El criterio de selección del modelo fue considerar un R^2 mayor a 0.60, suficiente para considerarlo significativo (Gómez y Gómez 1984).

Para el análisis de la variancia y las pruebas de Duncan se usó el programa estadístico SAS y para el estudio de la regresión se usó Excel.

CAPÍTULO IV

RESULTADOS Y DISCUSIONES

Los resultados están expuestos a base de Tablas, Figuras y las discusiones respectivas.

4.1. Determinación de la supervivencia de *R. meliloti* en los sustratos de turba, estiércol de lombriz y compost.

Tabla 13. Análisis de variancia del diseño factorial 3 x 4 de la supervivencia del N° de *R. meliloti* viables/ gramo de sustrato (datos transformados a \log_{10}).

Fuente	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado de la media	F-valor	Pr>f
Sustrato	2	1.82274017	0.91137008	3.08	0.0580
Tiempo	3	9.2705079	3.0901693	10.46	<0.0001
Tiempo*sustrato	6	4.18429117	0.69738186	2.36	0.0500
Error	36	10.63640225	0.2954562		
Total	47	25.91394148			

C.V. = 5.75 %

La tabla 13, del análisis de variancia nos ha permitido determinar la prueba de F para los factores y su interacción entre ellos. Concluyendo que para el factor tiempo, al comparar el valor de p es menor que alfa 0.05; es decir, nos indica que existe diferencia significativa en la supervivencia del *R. meliloti* para los diferentes niveles de tiempo (30, 60, 90 y 120 días) que duró el estudio. Así como para la interacción entre el tipo de sustrato y los niveles de tiempo (30, 60, 90 y 120 días), consideramos que también son diferentes significativamente.

Sin embargo, para el tipo de sustrato (turba, estiércol de lombriz y compost) no existe diferencia significativa, por lo que se concluye que el tipo de sustrato no influye en la supervivencia del *R. meliloti*.

El coeficiente de variación (5.75 %) se encuentra dentro de los rangos de confiabilidad para trabajos a nivel de laboratorio (Vásquez 1980) citado por (Vilela 1999).

Tabla 14. Prueba de Rango Múltiple de Duncan de las medias en la supervivencia del *R. meliloti*.

Combinacion de tratamientos	Media	Duncan
9	10.7455	A
1	10.0818	A
10	9.7408	B
6	9.6075	B
5	9.4908	B
3	9.4678	B
4	9.4348	B
2	9.3445	B
11	9.2378	B
8	8.833	C
7	8.748	C
12	8.6128	D

En la tabla 14, prueba de rango múltiple de Duncan al 5% de probabilidad, se demuestra que los tratamientos 9 y 1 correspondiente a compost x 30 días y turba x 30 días de evaluación, estadísticamente son iguales y superiores a los demás tratamientos, con una carga bacteriana de 7.0×10^{10} y 2.6×10^{10} N° de bacterias /gramo de sustrato respectivamente. Cuyos valores son similares a los descritos por Santillana y Freire (1995) quien obtuvo resultados de un número de bacterias por gramo de inoculante superior a 10^9 en la turba, y superiores, a los obtenidos por Vilela (1999) para la turba con una viabilidad de *Rhizobium* por gramo de sustrato de 5.40×10^8 .

Los tratamientos siguientes de acuerdo al orden de significancia presentan cargas bacterianas superiores a 1×10^9 , 7.8×10^8 y 4.2×10^8 N° de bacterias viables/gramo de sustrato. Obteniendo resultados superiores en el estiércol de lombriz a los resultados expuestos por Vilela (1999), quien obtuvo una carga bacteriana de 0.57×10^8 N° de bacterias viables/gramo de sustrato al cabo de 210 días. Cuyos valores se

encuentran dentro de la recomendación por CIAT (1987), que considera que 2×10^7 rizobios/gramo de inoculante son las cantidades mínimas de rizobios requeridas para obtener una nodulación adecuada.

En la Figura 6 se observa que los sustratos turba y compost a los 30 días de inoculación o impregnación llega al máximo número de bacterias viables/ gramo de sustrato, dándonos a conocer que es el tiempo más adecuado de estos soportes para un control de calidad, a diferencia del estiércol de lombriz que llega máximo número de bacterias viables/ gramo de sustrato a los 60 días. El resultado obtenido es distinto a Vilela (1999) determinando a los 90 días el máximo número de *Rhizobium l.*/ gramo de sustrato de turba y estiércol de lombriz.

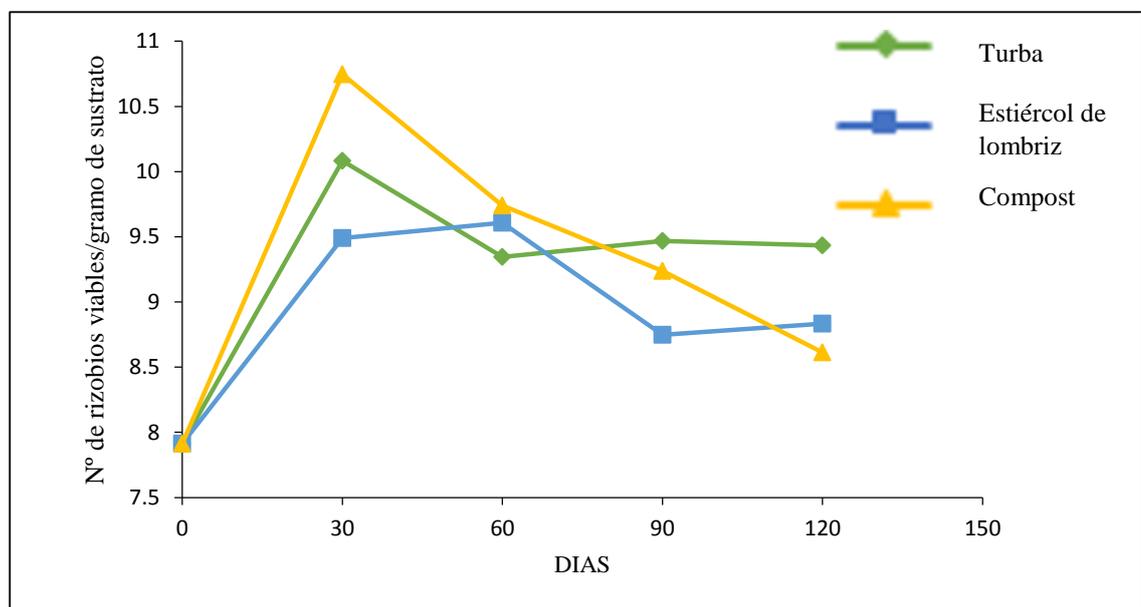


Figura 6. supervivencia del *Rhizobium* con las medias de los sustratos para 30, 60, 90 y 120 días.

Tabla 15. Prueba de Rango Múltiple de Duncan con las medias para los 120 días de evaluación después de la impregnación del inoculante en cada uno de los sustratos.

Sustrato	Media	Duncan
Turba	9.4348	A
Estiercol de Lombriz	8.833	B
Compost	8.6128	B

En la tabla 15 de la prueba de rango múltiple de Duncan al 5% de probabilidad, nos muestra que a los 120 días después de la impregnación del inoculante, la turba es estadísticamente significativa con una carga bacteriana de 2.8×10^9 N° de *Rhizobium*/gramos de sustrato, siendo superior al estiércol de lombriz y compost 7.8×10^8 y 4.0×10^8 respectivamente, demostrándonos que la turba es el mejor soporte para la producción de inoculantes, coincidiendo con Vilela (1999) quien menciona que el número de bacterias/ gramo de sustrato en la turba es superior que en el estiércol de lombriz.

Sin embargo, el estiércol de lombriz y compost a los 120 días muestran una carga bacteriana cuyos valores se encuentran dentro de las normas exigidas para rizobios en diferentes países mencionado por Izaguirre-Mayoral *et al.* (2007) quien alude que la concentración del microorganismo sea no menor a 10^8 cel/g de soporte. De igual manera estudios realizados por Mackie y Santillana (1987) señalan que la turba permite una adecuada viabilidad, a diferencia de otros soportes como el compost y bioabono. Sin embargo, en el estudio realizado nos muestra que el compost es un excelente soporte para la sobrevivencia del *R. meliloti*.

4.2. Comportamiento de la viabilidad para cada tipo de sustrato estudiados con los niveles de tiempo.

Tabla 16. Viabilidad o supervivencia de *R. meliloti* por gramo del sustrato de turba después de la impregnación. (30,60, 90 y120 días).

Sustrato	Tiempo	Media (datos transformados a \log_{10})
Turba	30	10.08
	60	9.34
	90	9.47
	120	9.43

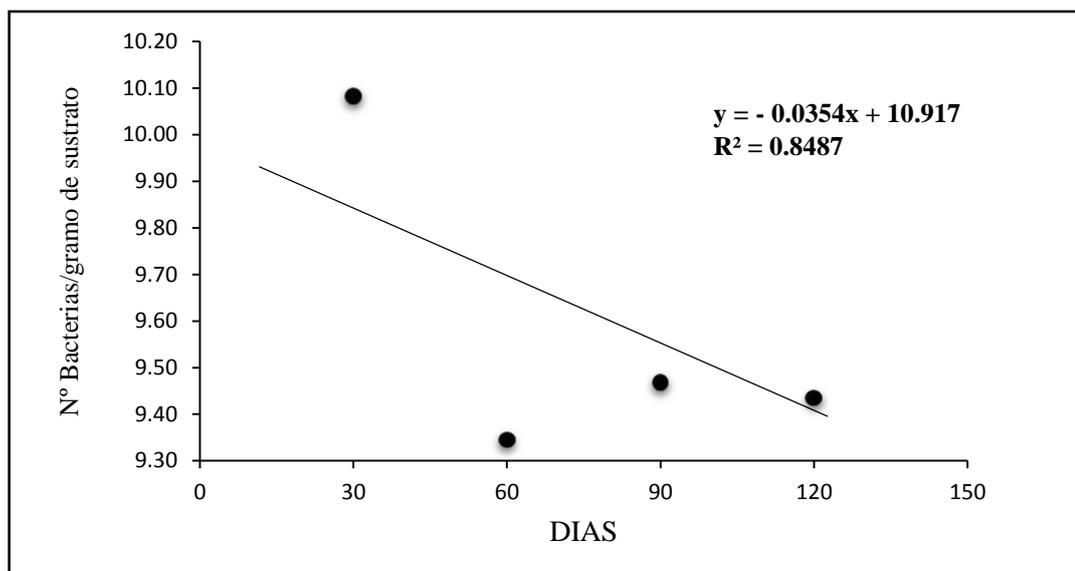


Figura 7. Viabilidad o sobrevivencia de *R. meliloti* por gramo de sustrato turba después de la impregnación.

La tabla 16, nos muestra las medias transformadas a \log_{10} de la supervivencia de *R. meliloti* por gramo de sustrato para la turba, después de la impregnación del inoculante a los 30, 60, 90 y 120 días. En el análisis de regresión lineal simple se observa, que conforme se incrementa el número de días van disminuyendo el número de bacterias viables/ gramo de sustrato (turba), como se aprecia en la Figura 8, posiblemente debido a la competencia y agotamiento de los nutrientes por las bacterias o por la acumulación de productos tóxicos, tal como lo menciona Bado *et al.* (2008) que el agotamiento de los nutrientes o la acumulación de productos tóxicos, determina el cese del crecimiento, incrementando la tasa de muerte y el número de bacterias viables disminuye rápidamente, y por lo tanto la curva de crecimiento declina.

Los resultados mostrados coinciden con Santillana y Freire (1995), quien menciona que a los 30 días del periodo de maduración del inoculante existe un aumento acentuado del número de células por gramo de inoculantes superiores a 10^9 , presentando un ligero declive conforme pasa los días del estudio. El coeficiente de determinación ($R^2 = 0.8484$), nos indica que el 84.84% del número de células viables en la turba depende del factor tiempo y el 15.16 % se debe a otros factores. Y un 0.0354 número de células de *Rhizobium*/ gramo de sustrato disminuye por día.

Tabla 17. Viabilidad o sobrevivencia de *R. meliloti* por gramo de sustrato de estiércol de lombriz después de la impregnación.

Sustrato	Tiempo	Media (datos transformados a log ₁₀)
Estiércol de lombriz	30	9.49075
	60	9.6075
	90	8.748
	120	8.833

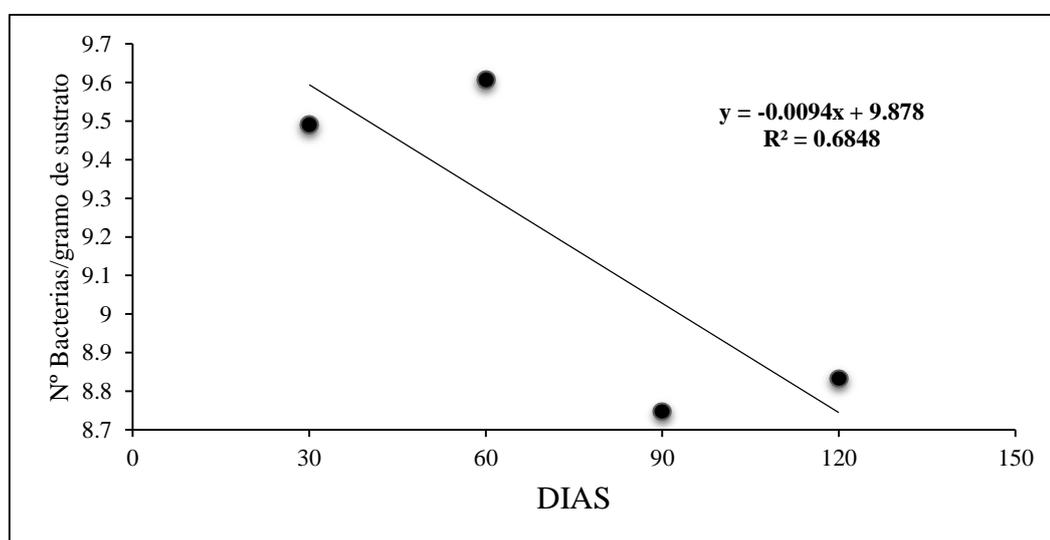


Figura 8. Viabilidad o sobrevivencia de *R. meliloti* por gramo de sustrato estiércol de lombriz después de la impregnación. Datos transformados a Log₁₀.

La tabla 17, nos muestra las medias transformadas a Log₁₀ de la sobrevivencia de *R. meliloti* por gramo de sustrato para el estiércol de lombriz, después de la impregnación del inoculante a los 30, 60, 90 y 120 días, donde a los 60 días se obtiene una mayor carga bacteriana y a los 120 días se tiene una carga bacteriana 7.8×10^8 el mismo que se encuentra dentro de las normas de comercialización de rizobios viables en soportes, como lo señala Izaguirre-Mayoral *et al.* (2007).

La tendencia lineal (Figura 8) es similar a la turba y se observa que para cada día que se almacena el inoculante a base de sustrato estiércol de lombriz disminuye su capacidad de supervivencia del *R. meliloti* en 0.0009 bacterias viables/ gramo de

sustrato. Llegando a los 60 días su máximo crecimiento y disminuyendo como pasa los días de almacenamiento del inoculante. Presentando un comportamiento significativo ($R^2 = 0.6848$), es decir que el, 68.48 % de la disminución de las bacterias/ gramo de sustrato se debe al factor tiempo y el 31.52 % se debe a otros factores (agotamiento de los nutrientes o la acumulación de productos tóxicos)

Tabla 18. Viabilidad o supervivencia de *R. meliloti* por gramo de sustrato compost después de la impregnación

Sustrato	Tiempo	Media (datos transformados a \log_{10})
Compost	30	10.7455
	60	9.74075
	90	9.23775
	120	8.61275

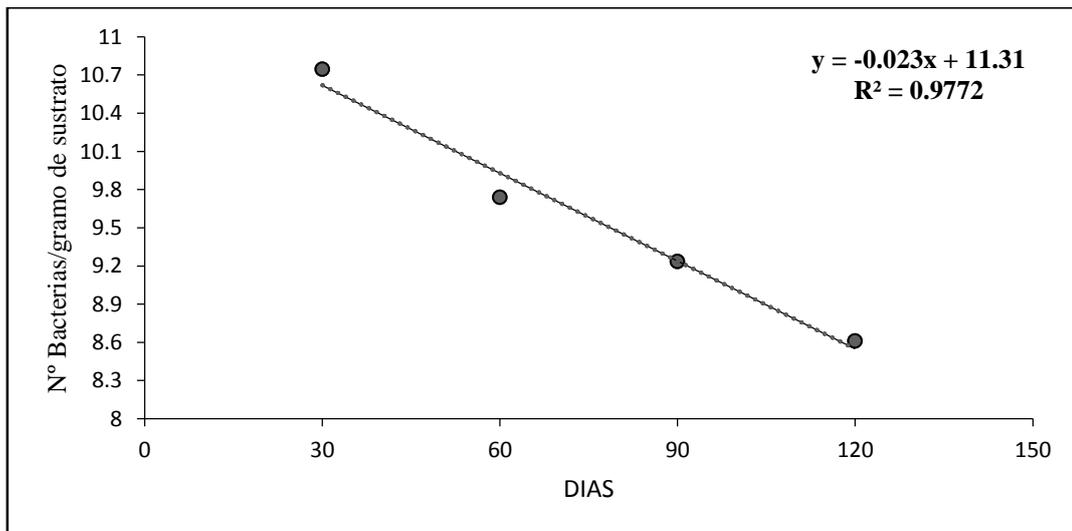


Figura 9. Viabilidad o supervivencia de *R. meliloti* por gramo de sustrato estiercol de lombriz después de la impregnación. Datos transformados a \log_{10} .

La tabla 18 nos muestra las medias transformadas a \log_{10} de la supervivencia de *R. meliloti* por gramo de sustrato para el compost, después de la impregnación del inoculante a los 30, 60, 90 y 120 días.

En la figura 8, del estudio de la regresión simple es semejante a la turba y estiercol de lombriz, visualizándose que a los 30 días se obtiene una mayor supervivencia de

R. meliloti/ gramo de sustrato, disminuyendo en 0.023 bacterias viables/ gramo de sustrato por día.

Presentando un coeficiente de determinación de ($R^2 = 0.9772$), es decir el 97.72 % de la disminución del N° de *Rhizobium* se debe al factor tiempo, y el 2.28 a otros factores como agotamiento de los nutrientes o la acumulación de productos tóxicos, mencionado por Bado *et al.* (2008).

CAPÍTULO V

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

5.1. Conclusiones

1. La mejor supervivencia del *R. meliloti* se obtuvo en los tratamientos a₁b₁ y a₃b₁ correspondiente a compost y turba a los 30 días después de la impregnación con una carga bacteriana de 7.0×10^{10} y 2.6×10^{10} N° de *Rhizobium*/ gramo de sustrato respectivamente, a una temperatura promedio de 20 °C y humedad relativa de 45.5 %.
2. A los 120 días que duró la evaluación, la turba presentó ser el mejor sustrato para la producción de inoculantes con una carga bacteriana de 2.8×10^9 N° de *Rhizobium*/ gramos de sustrato, siendo superior al estiércol de lombriz y compost con 7.8×10^8 y 4.0×10^8 *Rhizobium*/ gramos de sustrato respectivamente.
3. El compost al cabo de 120 días, presentó una carga bacteriana menor que los demás sustratos (4.0×10^8 rizobios viables promedio /gramo de sustrato), cuyo rango se encuentra dentro de los estudios establecidos para rizobios viables.

5.2. Recomendaciones

Para el sustrato estiércol de lombriz, esterilizar 01 hora diaria más para una segura eliminación de hongos y bacterias, ya que se determinó tener contaminantes resistentes, en comparación a los otros sustratos en estudio.

CAPÍTULO VI

LITERATURA CITADA

- Alexander, M. 1980. Introducción a la Microbiología del Suelo. Editor S.A. México. 491 p.
- Ayala, L. 1982. Aspectos biológicos, agronómicos y tecnológicos de la Rhizobiología. Serie Especial N° 2-02. Maracay, Venezuela. 78 p.
- Ben Rebah, F; Prévost, D; Yezza, A; Tyagi, RD. 2007. Agro-industrial waste materials and wastewater sludge for rhizobial inoculant production: a review. *Bioresource Technology*, v.98. p. 3535-3546.
- Bado, I; García, V; Grotiuz, G; Varela, G. 2008. Bacteriología y Virología Médica: Fisiología y metabolismo bacteriano. 3ra ed. Montevideo, Paraguay. 56 p.
- Bécquer, C.J. 2004. Descripción y clasificación de rizobios: enfoque histórico, métodos y tendencias actuales. *Revista Biología* Vol. 18 N°. 1. Cuba.
- Buckman, H. 1993. Naturaleza y Propiedades de los Suelos. Noriega, U. (Ed). México. 590 p.
- Brock, T; Madigan, MT. 1993. Microbiología. 6 Ed. Prentice Hall Hispanoamérica S. A. México. ISBN 968-880-325-1. 327-334 p.
- Chipana Laura, V. 2003. Optimización de parámetros para la producción de *Rhizobium meliloti* en una fermentación discontinua. Tesis pregrado. Tacna, Perú, Universidad Nacional Jorge Basadre Grohmann.
- Delgado, M; Casella, S; Bedmer, E. 2007. Denitrification in rhizobia – Legume Symbiosis. *Biology of the Nitrogen Cycle*.

- Calla, E. 1997. Evaluación de la Nodulación del cultivo de Maní (*Arachis hipogea* L.) con Cepas de *Rhizobium leguminosarum*, *Rhizobium phaseoli*, *Rhizobium* sp. A Nivel de Invernadero. Tesis de Pre Grado. Universidad Nacional de Cajamarca. Perú. 122 p.
- Camacho, A; Giles, M; Ortegón, A; Palao, M; Serrano, B; Velázquez, O. 2009. Técnicas para el Análisis Microbiológico de Alimentos. 2 ed. Facultad de Química, UNAM. México.
- Camargo, D. 2011. Desarrollo de un inoculante rizobiano para un nuevo cultivar de *Lotus uliginosus*. Tesis Mg. Uruguay. Universidad de la Republica Uruguay. 12-14 p.
- CIAT (Centro Internacional de Agricultor Tropical). 1987. Simbiosis Leguminosa Rhizobio: Evaluación, Selección y Manejo. Cali, Colombia. 33-35 p.
- CIAT (Centro Internacional de Agricultor Tropical). 1988. Simbiosis Leguminosa Rizobio: Manual de Métodos de Evaluación, Selección y Manejo Agronómico. Cali, Colombia. 5-1, 12-1 p.
- Cozzi, JG y Benintende, GB. 1989. Evolucion de Poblaciones de *Rhizobium meliloti* en Turba. Revista de la Facultad de Agronomía. 10(3): 139-144 p.
- Corvalan, D; Dubois, M; Medana, M; Racca, O; Peticari, A; y Ruiz, O. 2007. Biofertilizantes en Iberoamérica una visión técnica, científica y empresarial: Situación actual y perspectivas del mercado de semillas y biofertilizantes en la argentina. 1 ed. Izaguirre-Mayoral, ML; Labandera, C; Sanjuan, J (eds). Montevideo, Uruguay. Universitaria. 4 p.
- FAO (Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación). 2019. Terminología en la FAO. Consultado el 25 mar. 2019. Disponible en: <http://www.fao.org/termportal/thematic-glossaries/en/>

- FAO (Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación). 2009. Glosario de agricultura orgánica. Roma. 26 p.
- FAO (Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación). 1995. Manual Técnico de la Fijación Simbiótica del Nitrógeno: leguminosa/*Rhizobium*. Roma. ISBN.95-5-303199-9. p. 2-3/4.
- FONCODES (Fondo de Cooperación para el Desarrollo Social, Perú). 2014. Producción y uso de abonos orgánicos: biol, compost y humus. Lima, Perú. Manual Técnico N° 5. 22-40 p.
- Fernández, MM; Aguilar, MI; Carrique JR; Tortosa, J; García, C; López, M; Pérez, JM. 1998. Suelo y medio ambiente en invernaderos. Consejería de Agricultura y Pesca. Junta de Andalucía. Sevilla.
- Fillat, F; Puppo, D. 1994. Evaluación bioquímica y genética de aislamiento de rizobios que nodulan *Lotus subbiflorus*. Tesis de Grado. Facultad de Agronomía. Universidad de la Republica. Uruguay.
- Galibert F; Finan TM; Long SR; Puhler A; Abola P; Ampe F; Barloy-Hubler F; Barnett MJ; Becker A; Boistard P; Bothe G; Boutry M; Bowser L; Buhrmester J; Cadieu E; Capela D; Chain P; Cowie A; Davis RW; Dreano S; Federspiel NA; Fisher RF; Gloux S; Godrie T; Goffeau A; Golding B; Gouzy J; Gurjal M; Hernandez-Lucas I; Hong A; Huizar L; Hyman RW; Jones T; Kahn D; Kahn ML; Kalman S; Keating DH; Kiss E; Komp C; Lelaure V; Masuy D; Palm C; Peck MC; Pohl TM; Portetelle D; Purnelle B; Ramsperger U; Surzycki R; Thebault P; Vandenbol M; Vorholter FJ; Weidner S; Wells DH; Wong K; Yeh KC; Batut J. 2001. The composite genome of the legume symbiont *Sinorhizobium meliloti*. *Science* 293(5530): 668-672.
- Garro Alfaro, JE. 2017. El Suelo y los Abonos Orgánicos. Instituto Nacional de Innovación y Transferencia en Tecnología Agropecuaria. San José, Costa Rica. 27-43p.

- Gomez K A. y Gomez A.A.1984.statistical procedures for agrocltural research. John wiley & sons. Second edición new yor. 680 p.
- Guerrero, Y; Polo, A. 1990. Ecologia N° 04: Usos, Aplicaciones y Evaluación de Turbas. Icona, Madrid. 3 p.
- Jaramillo, DJ. 2002. Introducción a la ciencia del suelo (en línea). Universidad Nacional de Colombia. 619 p. Consultado el 21 mar. 2019. Disponible en: <http://bdigital.unal.edu.co/2242/1/70060838.2002.pdf>
- Jordán, A. 2006. Manual de edafología. Departamento de Cristalografía, Mineralogía y Química Agrícola. Universidad de Sevilla. 10 p.
- La Rosa, J. 1982. Inocule sus Leguminosas con bacterias. Servicio de investigación agropecuarias (boletín). Universidad Nacional de Cajamarca. Cajamarca, Perú.
- Lagares, A. 2015.la simbiosis fijadora de nitrógeno *Sinorhizobium meliloti* – alfalfa (medicago sativa): caracterización del rol biológico del ANR pequeño Sm8 en la vida libre y simbiótica de los rizobios. Tesis Dr. La plata, Argentina, Universidad Nacional de la Plata. 06 p.
- Labandera, C; Sicardi, M; Bathyany, C. 1970. Historia y fundamentos de la selección de cepas en el Uruguay; actas de la V reunión latinoamericana sobre *Rhizobium*. Brasil. 317-327 p.
- Labandera, C; Vincent, J. 1975. Loat of symbiotic capacity in commercially useful strains of *R. trifolli*. J. Appl. Bact. 39. 209-217 p.
- Labandera, C. 1982. Aspectos biológicos y tecnológicos de la Rhizobiología. Fondo Nacional de Investigaciones Agropecuarias. Centro de Investigaciones Agropecuarias. Comité Permanente de Rhizobiologos (Eds). Maracay, Venezuela. 49-53 p.

- Labandera, C. 1994. Comercio y Legislación sobre Inoculantes en Uruguay. Asociación Latinoamericana de Rhizobiología. Boletín N° 21. Montevideo, Uruguay. 15 p.
- Lira Saldivar, RH; Medina Torres, JG. 2007. Agricultura Sustentable y Biofertilizantes: sustentabilidad de la producción agrícola. Centro de Investigación en Química Aplicada (CIQA). Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro, Buenavista, Saltillo, Coah. México. p. 13-14.
- Lloret, L; Martinez-Romero, E. 2005. Evolución y filogenia de *Rhizobium*. Revista Latinoamericana de Microbiología. 47(1-2): 43-60.
- Marín, VA; Baldani, VL; Dos Santos, R; Baldani, IJ. 2003. Fijación biológica de nitrógeno; bacterias de nitrógeno de importancia para la agricultura tropical. Brasil: Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuaria.
- NOSTOC (Productos Ecológicos para la Agricultura y Jardinería, España). 2018. NOSTOC: Productos Sustitutivos al Abonado con Estiércol (en línea, sitio web). Consultado 14 ago. 2018. Disponible en: <https://nostoc.es/seis-productos-sustitutivos-abonado-estiercol>.
- Peralta Díaz H. 2007. Agricultura Sustentable y Biofertilizantes: biofertilizantes, bacterias promotoras del crecimiento y biofumigación. Centro de Ciencias Genómicas, Universidad Nacional Autónoma de México. Chamilpa, Cuernavaca, Mor., México. p. 121-128.
- Román, P; Martínez, MM.; Pantoja, A. 2013. Manual de compostaje del agricultor: Experiencias en América Latina. Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (eds). Santiago de Chile- ISBN 978-92-5-307845-5. 22-42 p.
- Roumiantseva ML; Andronov EE; Sharypova LA; Dammann-Kalinowski T; Keller M; Young JP; Simarov BV. 2002. Diversity of *Sinorhizobium meliloti* from the Central Asian alfalfa gene center. Appl Environ Microbiol 68 (9): 4694-4697.

- Ruíz Argueso, T; Santa María, J; Labandera, C; Orive, R. 1979. Crecimiento y sobrevivencia de *Rhizobium japonicum* CB 1809 y *Rhizobium trifolii* WU 290 en turbas españolas de diferentes orígenes. AN INIA/Aer.Prod.Veg. 11(8). España.
- Ruiz Sánchez, E; Tresierra Ayala, A. 2011. Curso de Bacteriología. Universidad Nacional de la Amazonia Peruana. p. 33.
- Rynk, R.1992. On-farm composting handbook.Northeast Regional Agricultural Engineering Service.Cooperative Extension. New York. 186 p.
- Santillana N; Freire J. 1995. Sobrevivencia de cepas de *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* en turba esterilizada y en semillas. Tesis de Grado. Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga. Ayacucho, Perú.
- Soto, G; Muñoz, C. 2002. Manejo Integrado de Plagas y Agroecología. N° 65. Costa Rica. 123-129 p.
- Vásquez, V. 1980. Experimentación agrícola. De. Amarù. 1° De. 278 p.
- Vilela Cacho, Nora. 1999. Comparativo de excretas de lombriz y la turba en la producción de inoculantes. Tesis de grado. Cajamarca, Perú. Universidad Nacional de Cajamarca. p. 56, 58.
- Wang, ET; Martínez Romero, J. s.f. Taxonomía de *Rhizobium*. Centro de investigación sobre Fijación de Nitrógeno, Universidad Nacional Autónoma de México.
- Zevenhuizen LP. 1981. Cellular glycogen, beta-1,2,-glucan, poly beta-hydroxybutyric acid and extracellular polysaccharides in fast-growing species of *Rhizobium*. Antonie Van Leeuwenhoek 47(6): 481-497.
- Zúñiga Dávila, D. 2007. Biofertilizantes en Iberoamérica una visión técnica, científica y empresarial: Leguminosas y producción de biofertilizantes en el Perú. 1 ed. Izaguirre-Mayoral, ML; Labandera, C; San Juan, J (eds). Montevideo, Uruguay. Universitaria. 61-65 p.

CAPÍTULO VI

ANEXOS

DIAS	REPETICIONES	SUSTRATOS		
		T1: TURBA	T2: EST. LOMBRIZ	T3: COMPOST
30	REPETICION 1	9.7×10^9	3.8×10^9	6.8×10^{10}
	REPETICION 2	2.0×10^9	$1.5E+10$	1.1×10^{11}
	REPETICION 3	8.0×10^{10}	3.0×10^8	1.5×10^{10}
	REPETICION 4	1.4×10^{10}	5.4×10^9	8.8×10^{10}
60	REPETICION 1	3.1×10^8	1.5×10^9	7.5×10^{10}
	REPETICION 2	6.9×10^9	1.9×10^{10}	3.2×10^8
	REPETICION 3	3.2×10^9	2.6×10^9	2.2×10^9
	REPETICION 4	3.6×10^9	3.5×10^9	1.8×10^{10}
90	REPETICION 1	3.0×10^9	4.6×10^8	3.0×10^8
	REPETICION 2	3.0×10^9	3.0×10^8	3.2×10^8
	REPETICION 3	3.0×10^9	1.1×10^9	2.8×10^9
	REPETICION 4	2.8×10^9	6.3×10^8	5.6×10^8
120	REPETICION 1	1.8×10^9	9.8×10^8	4.0×10^8
	REPETICION 2	4.0×10^9	3.0×10^8	4.0×10^8
	REPETICION 3	2.9×10^9	1.3×10^9	5.7×10^8
	REPETICION 4	2.7×10^9	5.7×10^8	3.1×10^8

DATOS ORIGINALES DE LA INVESTIGACIÓN

Tabla 19. Datos originales de la investigación

GLOSARIO DE TÉRMINOS

- a. FAO: Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación.
- b. FBN: fijación biológica de nitrógeno
- c. UFC: Unidades Formadoras de Colonias
- d. FONCODES: Fondo de Cooperación para el Desarrollo Social.
- e. NMP: Número más probable.
- f. pH: es una medida de la acidez o alcalinidad de una sustancia o sustrato (Jaramillo 2002).
- g. Nitrógeno: es uno de los elementos de mayor importancia para la nutrición de las plantas. Se asimila en forma catiónica de amonio NH_4^+ o aniónica de nitrato NO_3^- (FAO 2019).
- h. Bacterias: son organismos procariotas unicelulares, que pueden tener distintas formas; esféricas, alargadas o espirales.
- i. Cepa: Cultivo puro de una especie de microorganismo en cantidad, a partir de él.
- j. Impregnación: Acción de introducir las moléculas de un cuerpo dentro de otro, en cantidad perceptible, sin combinación.
- k. Inoculación: Proceso de aplicación de bacterias a las semillas o al suelo con la finalidad de hacer que estas permitan al aprovechamiento del nitrógeno atmosférico.
- l. Inoculantes: Son cultivos puros de bacterias que tienen turba u otro material como sustrato y que puede ser aplicados a las semillas o suelos con la finalidad de permitir a las plantas al aprovechamiento del nitrógeno atmosférico.

- m. Medio de cultivo: sustancia preparada en el laboratorio que tiene diferentes elementos nutritivos para los microorganismos, de modo que permitan el desarrollo de estos.
- n. Micra: milésima parte de un milímetro.
- o. Microorganismos: nombre genérico de los seres organizados, únicamente visibles al microscopio.
- p. Nódulos: Formulación en las raíces de las leguminosas, originados por la inversión de las bacterias *Rhizobium* a los pelos radiculares de dichas plantas, las cuales al multiplicarse forman protuberancias.
- q. Soporte para inoculantes: conjunto de materiales que intervienen en la elaboración de los inoculantes, generalmente está compuesto por arcilla, carbón, harina de alfalfa, turba, carbón de calcio.
- r. Sustrato: Medio o material sólido y estable que permite el normal desarrollo de vegetales y formas de vida

RESULTADOS ORIGINALES DE LOS SUSTRATOS

	UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA LA MOLINA FACULTAD DE AGRONOMIA LABORATORIO DE ANALISIS DE SUELOS, PLANTAS, AGUAS Y FERTILIZANTES						
INFORME DE ANALISIS DE MATERIA ORGANICA							
SOLICITANTE	:	PABLO RODRIGUEZ BECERRA					
PROCEDENCIA	:	CAJAMARCA/ CELENDIN					
MUESTRA DE	:	TURBA					
REFERENCIA	:	H.R. 65524					
BOLETA	:	2036					
FECHA	:	30/10/18					
Nº LAB	CLAVES	pH	C.E. dS/m	M.O. %	N %	P ₂ O ₅ %	K ₂ O %
964	T1	5.26	0.56	25.08	0.75	0.21	0.04
Nº LAB	CLAVES	CaO %	MgO %	Hd %	Na %		
964	T1	0.25	0.38	9.34	0.20		
				<i>Sady García Bendeziú</i> Jefe de Laboratorio			
Av. La Molina s/n Campus UNALM Telf.: 614-7800 Anexo 222 Teléfono Directo: 349-5622 e-mail: labsuelo@lamolina.edu.pe							

Figura 10. análisis físico químico del sustrato turba.



UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA LA MOLINA
FACULTAD DE AGRONOMIA
LABORATORIO DE ANALISIS DE SUELOS, PLANTAS, AGUAS Y FERTILIZANTES



INFORME DE ANALISIS DE MATERIA ORGANICA

SOLICITANTE : PABLO RODRIGUEZ BECERRA
PROCEDENCIA : CAJAMARCA/ CELENDIN
MUESTRA DE : ESTIERCOL DE LOMBRIZ
REFERENCIA : H.R. 65525
BOLETA : 2036
FECHA : 30/10/18

Nº LAB	CLAVES	pH	C.E. dS/m	M.O. %	N %	P ₂ O ₅ %	K ₂ O %
965	E1	6.91	13.70	38.28	1.73	2.51	1.56
966	E2	6.99	7.01	30.32	1.32	2.36	1.27

Nº LAB	CLAVES	CaO %	MgO %	Hd %	Na %
965	E1	7.63	0.88	45.31	0.41
966	E2	6.27	0.88	36.79	0.34



Sally García Bendezi
Jefe de Laboratorio

Av. La Molina s/n Campus UNALM
Telf.: 614-7800 Anexo 222 Teléfono Directo: 349-5622
e-mail: labsuelo@lamolina.edu.pe

Figura 11. Análisis físico químico del sustrato estiércol de lombriz.



UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA LA MOLINA
FACULTAD DE AGRONOMIA
LABORATORIO DE ANALISIS DE SUELOS, PLANTAS, AGUAS Y FERTILIZANTES



INFORME DE ANALISIS DE MATERIA ORGANICA

SOLICITANTE : PABLO RODRIGUEZ BECERRA
PROCEDENCIA : CAJAMARCA/ CELENDIN
MUESTRA DE : COMPOST
REFERENCIA : H.R. 65526
BOLETA : 2036
FECHA : 30/10/18

N° LAB	CLAVES	pH	C.E. dS/m	M.O. %	N %	P ₂ O ₅ %	K ₂ O %
967	C1	6.74	9.59	32.52	1.54	1.13	1.56
968	C2	6.74	6.75	25.77	0.85	0.62	0.78

N° LAB	CLAVES	CaO %	MgO %	Hd %	Na %
967	C1	3.33	0.53	46.57	0.26
968	C2	3.50	0.40	23.61	0.30



Sady García Bendezu
Jefe de Laboratorio

Av. La Molina s/n Campus UNALM
Telf.: 614-7800 Anexo 222 Teléfono Directo: 349-5622
e-mail: labsuelo@lamolina.edu.pe

Figura 12. análisis físico químico del sustrato compost.

PANEL FOTOGRÁFICO



Foto 1. Recolección e identificación de la muestra para su análisis físico químico.



Foto 2. Preparación de los sustratos



Foto 3. Pesaje de los sustratos



Foto 4. Envasado de los sustratos en bolsas de polietileno.



Foto 5. Preparación del caldo de cultivo.



Foto 6. Caldo de cultivo para inocular



Foto 7. Impregnación del medio de caldo de cultivo a los sustratos.



Foto 8. Homogenización del sustrato.



Foto 9. Incubación de los sustratos a 28 °C por 5 días.

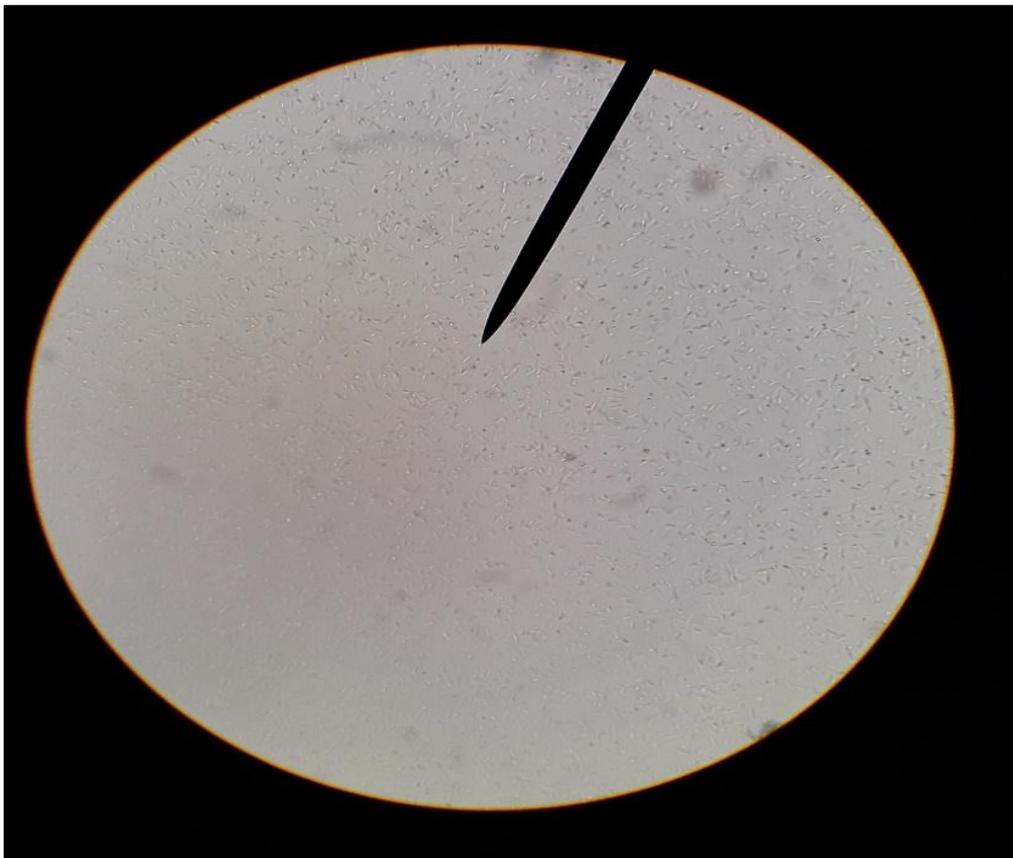


Foto 10. Vista del *Rhizobium meliloti* en el microscopio.



Foto 11. Dilución del inoculante.



Foto 12. contagio en placas Petri con medio de LMA (levadura-manitol-agar).



Foto 13. Contaje del número de bacterias de *Rhizobium meliloti*.