



UNIVERSIDAD NACIONAL DE LOJA

ÁREA AGROPECUARIA Y DE RECURSOS NATURALES
RENOVABLES

CARRERA DE INGENIERÍA AGRONÓMICA

**“VALIDACIÓN DE UN BIOINOCULANTE A BASE DE
BACTERIAS DIAZOTRÓFICAS EN EL CRECIMIENTO,
DESARROLLO Y RENDIMIENTO AGRÍCOLA DE
(*Phaseolus vulgaris* L.)”**

Tesis previa a la obtención del
Título de Ingeniera Agrónomo

AUTORA

Diana Carolina García

DIRECTOR

Ing. Iván Granda Mora Mg. Sc.

Loja – Ecuador
2015

CERTIFICACIÓN

Ing. Klever Iván Granda Mora Mg. Sc.

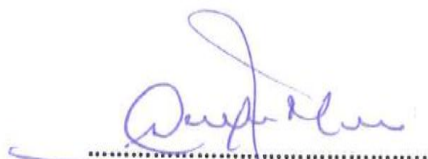
DIRECTOR DE TESIS

DOCENTE INVESTIGADOR DE LA UNIVERSIDAD NACIONAL DE LOJA

CERTIFICO:

Que el presente trabajo de investigación titulada “VALIDACIÓN DE UN BIOINOCULANTE A BASE DE BACTERIAS DIAZOTRÓFICAS EN EL CRECIMIENTO, DESARROLLO Y RENDIMIENTO AGRÍCOLA DE (*Phaseolus vulgaris* L.)”, realizado por la egresada, **Diana Carolina García**, previo a la obtención del Título de **INGENIERA AGRÓNOMO**, ha sido revisado y se autoriza su presentación final para la calificación correspondiente.

Loja 19 de octubre del 2015



Ing. Iván Granda Mora, Mg. Sc.

DIRECTOR

**“VALIDACIÓN DE UN BIOINOCULANTE A BASE DE BACTERIAS
DIAZOTRÓFICAS EN EL CRECIMIENTO, DESARROLLO Y
RENDIMIENTO AGRÍCOLA DE (*Phaseolus vulgaris* L.)”**

TESIS

**Presentada al tribunal de grado como requisito parcial para obtener el Título
de:**

INGENIERA AGRÓNOMO

en el

**ÁREA AGROPECUARIA Y DE RECURSOS NATURALES RENOVABLES
DE LA UNIVERSIDAD NACIONAL DE LOJA**

APROBADA:



Ing. Gilberto Álvarez Cajas

PRESIDENTE DEL TRIBUNAL



Ing. Klever Chamba Caillagua

VOCAL



Ing. Pablo Álvarez Figueroa Mg. Sc

VOCAL

Loja-Ecuador

2015

AUTORIA

Diana Carolina García, declaro ser autora del presente trabajo de Tesis y eximo expresamente a la Universidad Nacional de Loja y a sus representantes jurídicos, de posibles reclamos o acciones legales, por el contenido de la misma.

Adicionalmente acepto y autorizo a la Universidad Nacional de Loja, la publicación de mi Tesis en el Repositorio Institucional-Biblioteca Virtual.

Autora: Diana García

Firma:



Cedula: 1714780002

Fecha: 19/10/2015

**CARTA DE AUTORIZACIÓN DE TESIS POR PARTE DE LA AUTORA PARA LA
CONSULTA, REPRODUCCIÓN PARCIAL O TOTAL Y PUBLICACIÓN
ELECTRÓNICA DEL TEXTO COMPLETO**

Yo, **Diana Carolina García**, declaro ser autora de la Tesis titulada “**VALIDACIÓN DE UN BIOINOCULANTE A BASE DE BACTERIAS DIAZOTRÓFICAS EN EL CRECIMIENTO, DESARROLLO Y RENDIMIENTO AGRÍCOLA DE (*Phaseolus vulgaris* L.)**”. Como requisito para obtener el grado de Ingeniera Agrónomo, autorizo al sistema Bibliotecario de la Universidad Nacional de Loja para que con fines académicos, muestre al mundo la producción intelectual de la universidad, a través de la visibilidad de su contenido de la siguiente manera en el Registro Digital Institucional:

Los usuarios pueden consultar el contenido de este trabajo en el RDI, en las redes de información del país y del exterior, con las cuales tenga convenio la Universidad.

La Universidad Nacional de Loja, no se responsabiliza por el plagio o copia de la tesis que realice un tercero.

Para constancia de esta autorización, en la ciudad de Loja, a los veintiséis días del mes de octubre del dos mil quince, firma la autora.

Firma:.....

Autora: Diana Carolina García

Cedula: 1714780002

Dirección: Cayambe
dianitadcgr@hotmail.com

Correo electrónico:

Teléfono: 022138439

Celular: 0987973415

DATOS COMPLEMENTARIOS:

Director de tesis: Ing. Klever Iván Granda Mora, Mg. Sc.

Tribunal de grado:

Ing. Gilberto Álvarez Cajas

Ing. Klever Chamba Caillagua

Ing. Pablo Álvarez Figueroa

AGRADECIMIENTO

Mi agradecimiento muy sincero al Ing. Klever Iván Granda Mora Mg. Sc., Director de Tesis por su valiosa orientación para el logro de los objetivos propuestos ya que supo brindarme la confianza durante el desarrollo de la investigación, a la Universidad Nacional de Loja y de manera especial al Área Agropecuaria y de Recursos Naturales Renovables, Carrera de Ingeniería Agronómica, por haberme acogido durante la formación académica.

DEDICATORIA

A Dios por permitirme llegar a este momento tan especial en mi vida, por los triunfos y por el logro de poder culminar mi carrera, A mi familia quienes por ellos soy lo que soy. A mis padres Antonio y Piedad por su apoyo, consejos, comprensión, amor, ayuda en los momentos difíciles, y por ayudarme con los recursos necesarios para estudiar. Me han dado todo lo que soy como persona, mis valores, mis principios, mi carácter, mi empeño, mi perseverancia, mi coraje para conseguir mis objetivos. A mis hermanos por estar siempre presentes, acompañándome para poderme realizar. También una dedicatoria muy especial a mi esposo Carlos por su apoyo incondicional por no dejarme caer por siempre estar ahí, y sobre todo a mis hijas Antonella y Karla que son mi pilar fundamental para seguir adelante cumpliendo mis metas y mis sueños.

ÍNDICE GENERAL

CONTENIDO	Pág.
PORTADA	i
CERTIFICACIÓN DIRECTOR	ii
CERTIFICACIÓN TRIBUNAL	iii
AUTORIA	iv
CARTA DE AUTORIZACIÓN	v
AGRADECIMIENTO	vi
DEDICATORIA	vii
ÍNDICE GENERAL	viii
TITULO	xiv
RESUMEN	xv
SUMARY	xvi
1. INTRODUCCIÓN	1
2. REVISIÓN DE LITERATURA	3
2.1. GENERALIDADES DE LAS LEGUMINOSAS.	3
2.1.1. El fréjol (<i>Phaseolus vulgaris</i> L.)	3
2.1.2. Clasificación taxonómica	4
2.1.3. Requerimientos edafo-climáticos	4
2.1.4. Descripción botánica	5
2.1.5. Morfología	5
2.1.5.1. <u>Raíz</u>	5
2.1.5.2. <u>Tallo</u>	6
2.1.5.3. <u>Hojas</u>	6
2.1.5.4. <u>Flor</u>	6
2.1.5.5. <u>Fruto</u>	7
2.1.5.6. <u>Semillas</u>	7

2.1.6.	Fases fenológicas	7
2.1.7.	Rendimiento	8
2.2.	IMPORTANCIA DE LA FIJACIÓN DE NITRÓGENO	8
2.2.1	Ciclo del Nitrógeno	9
2.3.	FIJACIÓN BIOLÓGICA DE NITRÓGENO EN LEGUMINOSAS	12
2.4.	FIJACIÓN SIMBIÓTICA DE NITRÓGENO	13
2.4.1.	Fijación Simbiótica de Nitrógeno en Leguminosas	14
2.5.	LOS BIOFERTILIZANTES	14
2.6.	USO DE BIOINOCULANTES EN LA AGRICULTURA	16
2.6.1.	Efecto de los Bioinoculantes	16
2.6.2.	Ventajas del Uso de Bioinoculantes	16
2.6.3.	Formas de Aplicación	17
2.7.	IMPORTANCIA DE LOS BIOFERTILIZANTES EN LA AGRICULTURA	17
2.8.	LOS BIOFERTILIZANTES	21
3.	MATERIALES Y MÉTODOS	21
3.1.	UBICACIÓN GENERAL	21
3.1.1.	Ubicación Política y Geográfica	22
3.2.	MATERIALES	22
3.2.1.	Materiales, equipos y reactivos utilizados para la fase de laboratorio	22
3.2.2.	Materiales para la fase de campo	22
3.3.	METODOLOGÍA	22
3.3.1.	Metodología para el primer objetivo	22
3.3.2.	Metodología para el segundo objetivo	23
3.3.3.	Metodología para el tercer objetivo	
4.	RESULTADOS	25
4.1.	EFFECTO DEL BIOINOCULANTE SOBRE PARÁMETROS MORFOLÓGICOS, NODULACIÓN, BIOMASA, COMPONENTES DE RENDIMIENTO, PORCENTAJE DE (N) TOTAL Y RENDIMIENTO AGRÍCOLA DE LA VARIEDAD BOLA 60 EN CONDICIONES DE CAMPO.	25
4.1.1.	Características morfológicas	27

4.1.2.	Parámetros de nodulación	27
4.1.3.	Determinación de la biomasa en frejol variedad bola 60	28
4.1.4.	Componentes del Rendimiento	30
4.1.5.	Contenido total de nitrógeno	30
4.2.	DETERMINAR LA INFLUENCIA DE LA APLICACIÓN DEL BIOINOCULANTE SOBRE LAS PROPIEDADES FÍSICAS, QUÍMICAS Y MICROBIOLÓGICAS DEL SUELO EN EL SECTOR DE LA EXPERIMENTACIÓN.	31
4.2.1.	Propiedades Físicas del suelo	31
4.2.2.	Propiedades Químicas del suelo	31
4.2.3.	Evaluación Microbiológica	32
4.3.	ANÁLISIS DE BENEFICIO-COSTO DE LA APLICACIÓN DEL BIOINOCULANTE FRENTE A LA FERTILIZACIÓN QUÍMICA	32
5.	DISCUSIONES	35
6.	CONCLUSIONES	39
7.	RECOMENDACIONES	40
8.	BIBLIOGRAFÍA	41
9.	ANEXOS	47

INDICE DE CUADROS

Cuadro 1	Evaluación de parámetros morfológicos de la variedad frejol bola 60	27
Cuadro 2	Componentes de rendimiento de la variedad Bola 60.	30
Cuadro 3	Unidades formadoras de colonias en los análisis de suelo realizados en el lugar del experimento.	32
Cuadro 4	Ingresos por tratamiento de la variedad fréjol bola 60	33
Cuadro 5	Análisis de dominancia de la rentabilidad en el cultivo de frejol bola 60	33
Cuadro 6	Análisis marginal de la aplicación del Bioinoculante con respecto a la fertilización química.	34

INDICE DE FIGURAS

- Figura 1** Número de nódulos totales de la variedad frejol bola 60. **28**
Tratamientos: Control y Bioinoculante RIZOSUR. Letras desiguales en las columnas difieren para $p < 0,05$ Tukey
- Figura 2** Peso fresco y seco de nódulos (PFN y PSN) en la variedad frejol bola 60. **28**
Tratamientos: Control y Bioinoculante RIZOSUR. Letras desiguales en las columnas difieren para $p < 0,05$ Tukey.
- Figura 3** Peso fresco y seco del follaje en la variedad de frejol bola 60. **29**
Tratamientos: Control y Bioinoculante RIZOSUR. Letras desiguales en las columnas difieren para $p < 0,05$ Tukey.
- Figura 4** Peso fresco y peso seco de la raíz (PFR y PSR) en la variedad de frejol bola 60. **29**
Tratamientos: Control y Bioinoculante RIZOSUR. Letras desiguales en las columnas difieren para $p < 0,05$ Tukey
- Figura 5** (%) de nitrógeno total fijado por cada tratamiento en semilla en fresco y seco. **31**
Tratamientos: Control y Bioinoculante RIZOSUR.

INDICE DE ANEXOS

Anexo 1	Medios de cultivo para el aislamiento de microorganismos del suelo.	47
Anexo 2	Preparación de soluciones para determinar el porcentaje de Materia Orgánica	47
Anexo 3	Preparación de soluciones para determinar Nitrógeno Amoniacal en Suelos.	49
Anexo 4	Preparación de soluciones para determinar fósforo en Suelos.	49
Anexo 5	Preparación de soluciones para determinar potasio, calcio y magnesio en suelo	50
Anexo 6	Parámetros de nodulación, biomasa de la raíz y follaje a los 30 DDS en frejol bola Variedad 60, con tratamientos y réplicas.	51
Anexo 7	Componentes de rendimiento variedad bola 60 en condiciones de campo.	52
Anexo 8	Rendimiento agrícola de variedad bola 60 en condiciones de campo.	53
Anexo 9	Análisis físico y químico del suelo con sus interpretaciones	54
Anexo10	Porcentaje (%) de nitrógeno fijado por cada tratamiento ya sea en semilla en fresco y seco	56
Anexo 11	Tríptico del día de campo	57
Anexo 12	Evidencia fotográfica	59

**“VALIDACIÓN DE UN BIOINOCULANTE A BASE DE BACTERIAS
DIAZOTRÓFICAS EN EL CRECIMIENTO, DESARROLLO Y
RENDIMIENTO AGRÍCOLA DE (*Phaseolus vulgaris* L.)”**

RESUMEN

La presente Investigación se llevó a cabo con la finalidad de evaluar el efecto de un bioinoculante a base de bacterias diazotróficas simbióticas sobre parámetros morfológicos, biomasa y rendimiento agrícola en el cultivo de frejol común variedad bola 60. La investigación tuvo lugar a nivel de campo en el Sector San José-Catamayo, se empleó un diseño de bloques al azar con 2 tratamientos y 4 réplicas. A los 8, 15 y 21 días después de la siembra (DDS), se realizó la evaluación de los parámetros morfológicos: altura (cm) y el número de hojas de las plantas. A los 30 y 60 días (DDS), se evaluó los parámetros de nodulación, biomasa y rendimiento agrícola. Los análisis físicos, químicos y microbiológicos se realizaron al inicio y al final del experimento. En cuanto al análisis económico se llevó a cabo con los valores promedios ajustados de los rendimientos, costos e ingresos obtenidos según tratamiento a través de todo el ciclo del cultivo. Tanto los parámetros de nodulación, biomasa, componentes de rendimiento y rendimiento agrícola total se vieron incrementados con la inoculación del Bioinoculante con valores promedios de 6,92 t ha⁻¹ y de 4,59 t ha⁻¹ con respecto al Control. Así mismo el porcentaje de nitrógeno total se vio incrementado con la aplicación del Bioinoculante en 3,05 y 3% tanto en masa fresca y seca. Las propiedades físicas del suelo se mantuvieron igual, tanto al inicio como al final del experimento. No así las propiedades químicas donde la aplicación del Bioinoculante influyó positivamente en la reducción de pH alcalino del suelo, se incrementaron la materia orgánica y el N. Los resultados obtenidos con respecto al análisis microbiológico muestran un efecto positivo en el incremento de la carga microbiana para bacterias al final del experimento. El análisis económico reporta una tasa marginal de retorno para el tratamiento Bioinoculante de 845,90 % con correlación al Control, esta relación de beneficio neto marginal con los costos marginales/tratamiento, demuestra que el productor accederá a utilizar el Bioinoculante, ya que por cada 1,0 \$USD invertido en este producto biológico, hay un margen de utilidad de 8,45 \$USD, siendo el beneficio-costos (B/C) de 6,97 \$USD con la utilización del Bioinoculante y de 2,90 \$USD con respecto al Control.

Palabras clave: nodulación, bioinoculante, diazotróficas, simbióticas.

SUMMARY

This research was conducted in order to evaluate the effect of a Biological Inoculum based on symbiotic bacterial diazotrophs on morphological parameters, biomass and crop yield in the cultivation of the 60 ball common bean. The research took place in the field within the San Jose-Catamayo, and used a randomized block design with 2 treatments and 4 repetitions. At 8, 15 and 21 days after sowing (DAS), evaluation of the morphological parameters was performed based on height (cm) and the number of leaves per plant. At 30 and 60 days (DAS), the nodulation, and biomass parameters as well as crop yield were also evaluated. Physical, chemical and microbiological analyses were performed at both the beginning and end of the experiment. With respect to the economic analysis this was carried out using mean values adjusted in terms of yields, costs and revenues obtained according to the treatment throughout the crop cycle. As to the nodulation and biomass parameters together with the yield components and total agricultural yield this manifested an increase after the Biological Inoculum of average values of 6.92 t ha⁻¹ compared to the control of 4.59 t ha⁻¹. Likewise, the percentage of total nitrogen also increased with the application of the Biological Inoculum to 3.05% and 3% in both fresh and dry weight. The soil physical properties remained the same, both at the beginning and end of the experiment. In addition, the chemical properties where the application of Biological Inoculum took place positively contributed to the reduction of alkaline in the soil pH, and increased organic matter and nitrogen. The results obtained with respect to microbiological analyses showed a positive effect on the increase in the microbial load for bacteria at the end of the experiment. The economic analysis reported a marginal rate of return for treatment using the Biological Inoculum at 845.90% compared to the control. The marginal net benefit ratio to marginal costs / treatment demonstrated that the producer using the Biological Inoculum for every \$ 1.0 invested in this biological product, would make a profit of \$ 8.45, thus the cost-benefit (C / B) was \$ 6.97 for the use of the Biological Inoculum and \$ 2.90 with respect to the Control.

Keywords: Nodulation, Biological Inoculum, diazotrophs, Symbiotic.

1. INTRODUCCIÓN

En el Ecuador, el fréjol común es considerado la leguminosa más importante para el consumo humano directo, no solamente por la superficie cultivada, sino también por ser un cultivo que garantiza la seguridad y soberanía alimentaria de miles de familias de pequeños productores y consumidores (INEC-ESPAC, 2013). Las leguminosas en la región interandina son sembradas especialmente por el pequeño y mediano agricultor, en suelos bajos en contenido de nutrientes especialmente nitrógeno y algunos micronutrientes (INIAP, 2001).

En el año 2000 la superficie sembrada de frejol ocupaba 105.127 ha con una producción de 18.051 TM y para el año 2012 llegaba solo a 38.154 ha con una producción de 9.900 TM (SINAGAP, 2013). Como puede apreciarse, existe una alta tendencia a la disminución del cultivo de este grano, fundamentalmente en los últimos 10 años. Tanto el área cosechada como sus producciones son las más bajas en este periodo, comportándose de este mismo modo sus rendimientos agrícolas, los cuales alcanzan un promedio de 0,28 TM ha⁻¹ (ESPAC, 2013). Paradójicamente el fréjol común es el único capaz de devolver al suelo y a la atmósfera niveles de nitrógeno que contribuyen a la estabilidad del ciclo de este vital elemento para la biosfera.

Sumado a esto, la utilización desmedida de fertilizantes químicos para reponer los nutrientes removidos del suelo a través de la cosecha han producido que cada año se siga utilizando más y más cantidades de fertilizantes nitrogenados, debido a su sistemático uso con el fin de obtener los rendimientos deseados. Teniendo en cuenta estas proyecciones, con una creciente demanda de alimentos, se hace evidente que es preciso cambiar el paradigma de la producción agrícola y la búsqueda de alternativas que contribuyan a reducir la producción y aplicación de fertilizantes sintéticos y a la vez sanear nuestras producciones agrícolas.

Los inoculantes microbianos representan una nueva tecnología conducente a mejorar la productividad del sistema agropecuario a largo plazo. Puede ser considerada como una tecnología limpia, alineada con principios de la agricultura sustentable, frente al aumento desmedido de la utilización de pesticidas y fertilizantes en estos últimos tiempos. Varios microorganismos son utilizados en

la práctica agrícola habitual, y otros tienen potencialidad para ser utilizados en el futuro (Maddonni *et al.*, 2004; Naiman *et al.*, 2009).

La incorporación de microorganismos seleccionados como Bioinoculantes por sus funciones en diversos procesos que contribuyan a la implantación, desarrollo y producción de cultivos es una alternativa que permite lograr aumentos en el crecimiento radical, y por ende el incremento de biomasa foliar. Dentro de estos organismos benéficos las bacterias fijadoras de nitrógeno particularmente las del género *Rhizobium* contribuyen a la nutrición de las plantas, tanto en ecosistemas agrícolas como naturales (Smith y Read 2008).

La producción y comercialización de Bioinoculantes está encaminado al fortalecimiento de sistemas de producción sostenible, esto en respuesta a la preocupación que a nivel mundial se ha generado en la demanda de productos alimenticios, que no repercuten en la contaminación ambiental en la que actualmente estamos inmersos (Dibut, 2010).

Frente a estas consideraciones favorables para la agricultura sostenible, en el presente estudio se validó el bioinoculante RIZOSUR producido en la Universidad Nacional de Loja bajo condiciones de campo, con el fin de evaluar su efecto en parámetros morfológicos, biomasa y rendimiento agrícola en una variedad local de frejol común. Para el cumplimiento de estas actividades se plantearon los siguientes objetivos.

- Evaluar el efecto del bioinoculante sobre parámetros de nodulación, biomasa, componentes de rendimiento, porcentaje de N total y rendimiento agrícola de la variedad bola 60 en condiciones de campo.
- Determinar la influencia de la aplicación del bioinoculante sobre las propiedades físicas, químicas y microbiológicas del suelo en el área de experimentación.
- Realizar un análisis de beneficio-costos de la aplicación del bioinoculante frente a la fertilización química.

2. REVISIÓN DE LITERATURA

2.1 GENERALIDADES DE LAS LEGUMINOSAS

Las leguminosas constituyen un gran grupo de organismos vegetales, dentro de los que se destacan árboles, arbustos, hierbas y enredaderas. La familia Leguminosa es la tercera familia más grande de las plantas con flores con distribución en todo el mundo (Contreras *et al.*, 2007). Existen 7000 géneros y 14000 especies de leguminosas y lo más probable es que se usen 100 leguminosas importantes para la agricultura, pero no se han analizado todas para establecer su capacidad de fijar nitrógeno (Romero, 2009).

Esta diversidad permite una notable adaptabilidad genética; por ello, cada región con sus características pedoclimáticas específicas puede cultivar una o varias especies de leguminosas con éxito (Lafarga y Delgado, 2007), su nombre deriva del latín legumen (semilla con vaina) y presentan una importancia particular en la alimentación humana (granos) y animal (forraje), además de ser fuente de maderas tropicales valiosas, drogas para la medicina, plantas ornamentales, resinas, al igual que en la economía del nitrógeno del suelo (Contreras *et al.*, 2007).

2.1.1 El fréjol (*Phaseolus vulgaris* L.)

El centro de origen del fréjol es la región de Mesoamérica (Vargas-Vázquez *et al.*, 2008), investigaciones arqueológicas han permitido ubicar restos en diversos sitios de Estados Unidos, México y Perú (Voyses, 2000). A pesar que, como puede verse, en América Latina el fréjol ha venido cultivándose desde tiempos ancestrales no se sabe cuándo el fréjol escapó de la parcela familiar para convertirse en un cultivo de importancia económica (Rivas, 2004).

El fréjol común por la superficie cultivada, es la tercera leguminosa más importante a nivel mundial, superado solamente por la soya (*Glycine max* L. Merr) y el maní (*Arachis hipogea* L.) (Cevallos, 2008). Su importancia radica por el alto contenido de carbohidratos, principalmente en forma de almidón como fuente de energía, por su contenido de fibra dietética,

especialmente fibra soluble, y por el aporte de proteína, lípidos, así como de minerales y vitaminas (Silva, 2007). Además, esta leguminosa constituye un complemento nutricional al consumo de los cereales, especialmente del maíz (Pérez *et al.*, 2002). Es cultivada principalmente por sus vainas verdes, granos tiernos y granos secos, aunque en algunos países de Latinoamérica y África se consumen las hojas y flores jóvenes y tiernas como vegetales frescos. Además, las hojas verdes, los tallos y las vainas son alimento para el ganado, al igual que los rastrojos de las plantas secas que son usados también como abono para aumentar la materia orgánica del suelo (Rodiño, 2000)

2.1.2 Clasificación taxonómica

Nombre vulgar: Frijol, frejol, poroto etc.

Reino: Plantae

División: Magnoliophyta

Clase: Magnoliopsida

Subclase: Rosidae

Orden: Fabales

Familia: Fabaceae

Género: *Phaseolus*

Especie: *vulgaris*

Nombre binomial: *Phaseolus vulgaris* L.

Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad (CONABIO, 2009)

2.1.3 Requerimientos edafo-climáticos

El fréjol voluble o trepador, está localizado en las provincias de Carchi, Imbabura, Pichincha, Chimborazo, Bolívar y Loja, el requerimiento en

cuanto a la altitud es 2 000 - 2 900 msnm. El suelo apto para el desarrollo de este cultivo es el franco, suelto, permeable con buen drenaje con un pH entre 5.5 - 6.8, se desarrolla en zonas con temperaturas que van de 13 a 26 °C con una pluviometría de 800 - 2000 mm anuales (Quishpe, 2012).

2.1.4 Descripción botánica

El fréjol generalmente se lo considera como una planta anual, cuyo ciclo vegetativo lo cumple entre 70 y 140 días dependiendo de la variedad. Como se conoce, por hábito de crecimiento de los fréjoles se clasifica en tres grupos: arbustivos, semiguiajeros y guiajeros (García 1989 citado por Solórzano y Orellana 1991).

La planta de fréjol cuenta con un sistema radicular bien ramificado (Díaz, 2010). El tallo joven es herbáceo y semileñoso, al final del ciclo puede ser identificado por el eje central de la planta el cual está formado por una sucesión de nudos y entrenudos (Fernández, 2008), donde se insertan las hojas y los diversos complejos axilares. Las hojas están compuestas por tres folíolos con extremos acuminados, enteros ovales y terminados en punta, son acorazados, de consistencia áspera y de bordes lisos, peciolados y con estípulas angostas en la base (Rivas, 2004).

Las flores son pequeñas, labiadas y su color varía del blanco al azul. Las flores se autopolinizan, por lo cual la semilla generalmente conserva los buenos caracteres hereditarios. Las flores polinizadas producen legumbres de forma recta o encorvada, de 10 a 15 centímetros de longitud, que contienen entre 5 y 10 semillas (Díaz, 2010). La semilla se origina de un óvulo encorvado, no posee albumen, por lo que sus reservas nutritivas se concentran en los cotiledones (Cevallos, 2008) y pueden ser consumidas tanto inmaduras como secas (Rodríguez *et al.*, 1997).

2.1.5 Morfología

2.1.5.1 Raíz

En los primeros estados de crecimiento, el sistema radical está formado por la radícula del embrión, la cual luego se convierte en la raíz principal o

primaria, a partir de la cual aparecen las raíces secundarias y luego, de éstas las terciarias (Debouck *et al.*, 2004).

La raíz de la planta de fréjol es fibrosa y presenta gran cantidad de nodulaciones, debido a la simbiosis bacterial localizada en la corteza de las ramificaciones laterales (Vega y Chiriboga, 2004).

2.1.5.2 Tallo

El tallo es herbáceo y con sección cilíndrica o levemente angular. Puede ser erecto, semipostrado o postrado, se origina del meristema apical del embrión de la semilla (Debouck *et al.*, 2004). El tallo en la planta madura es aristado o cilíndrico y posee la médula hueca, cuya pared externa puede ser pubescente o lisa (Ruiz y Rincón, 2006).

Al inicio de la fase reproductiva de la planta el tallo termina en una inflorescencia (racimo) cuyas inserciones se desarrollan primero en flores y después en vainas (Debouck *et al.*, 2004).

2.1.5.3 Hojas

La planta de fréjol posee hojas simples y compuestas, insertadas en los nudos del tallo y ramas, las hojas simples sólo aparecen en el primer estado de crecimiento de la planta y se acomodan en el segundo nudo del tallo; las hojas compuestas son trifoliadas de diversos tamaños (Ortubé y Aguilera, 2007). Los folíolos de las hojas son acuminados y asimétricos, de forma alargada a triangular. Las hojas siempre están asociadas con estípulas presentes en los nudos, a nivel de las hojas primarias son bífidas.

2.1.5.4 Flor

La flor es hermafrodita, zigomorfa, papilionácea, de colores variados; los órganos masculinos y femeninos se encuentran encerrados en una envoltura floral, ofreciendo pocas posibilidades para el cruzamiento entre variedades; la polinización ocurre uno o dos días antes de la apertura de las envolturas florales (Debouck *et al.*, 2004). La flor comprende dos estados de desarrollo

botón floral y flor abierta, el primero presenta una envoltura de bracteolas de forma ovalada o redonda, al abrirse la flor estas bracteolas cubren solo el cáliz. La flor presenta simetría bilateral, y su morfología favorece la autopolinización (Ortúbe y Aguilera, 2007).

2.1.5.5 Fruto

El fruto es una vaina con dos valvas, las cuales provienen de un ovario comprimido. Las valvas se unen por dos suturas: una dorsal y otra ventral. Los óvulos, futuras semillas están adheridos alternadamente a la sutura ventral y por ende alternan en las dos valvas (Debouck *et al.*, 2004).

2.1.5.6 Semillas

La semilla se origina de un óvulo campilotropo, no posee albumen, por lo que sus reservas nutritivas se concentran en los cotiledones. En base a materia seca el 9 % representa la testa o cubierta, los cotiledones representan un 90 %, siendo el 1 % correspondiente al embrión (Debouck *et al.*, 2004). La semilla en el fréjol común tiene diferentes formas desde esférica hasta casi cilíndrica, su coloración externa también varía mucho, de negro a blanco y pasa prácticamente por todos los colores y puede ser uniforme, jaspeada, punteada o manchada (Ruiz y Rincón, 2006). Esta gran variabilidad de los caracteres externos de la semilla se tiene en cuenta para la clasificación de variedades de fréjol como consecuencia de la gran diversidad genética que existe dentro de esta especie (Brauer, 2000).

2.1.6 Fases fenológicas

El desarrollo de la planta de fréjol se divide en dos fases sucesivas principales: fase vegetativa y fase reproductiva. La fase vegetativa se inicia con la germinación de la semilla y termina con la aparición de los primeros botones florales. Por su parte, la fase reproductiva da inicio con la aparición de los botones florales, hasta la madurez de cosecha (Fernández *et al.*, 1991 citado por Chavarín *et al.*, 2008).

El ciclo biológico del fréjol cambia según el genotipo y los factores del clima; durante el desarrollo de la planta se presentan cambios morfológicos y fisiológicos que sirven de base para identificar las etapas de desarrollo del cultivo (Expósito, 2011). En fréjol existen 10 etapas que conforman la escala de desarrollo de la planta, delimitadas por eventos fisiológicos importantes en el proceso (Rodríguez *et al.*, 1997).

CIAT (1986), señala que las primeras cinco correspondientes a la etapa vegetativa: germinación (V0), emergencia (V1), hojas primarias (V2), primera hoja trifoliada (V3) y tercera hoja trifoliada (V4); y las cinco etapas restantes, a la etapa reproductiva: prefloración (R5), floración (R6), formación de vainas (R7), llenado de vainas (R8) y madurez fisiológica (R9).

2.1.7 Rendimiento

Según INEC (2013), la superficie sembrada de fréjol en cultivo solo fue de 38 858 ha de las cuales se cosecharon 32 960 ha equivalentes a 10 774 Tm; mientras que en asocio la superficie sembrada fue de 27 682 ha y la cosechada de 22 304 lo que equivalen a 4 357 Tm. El promedio nacional de producción por hectárea de fréjol seco es de 18 qq ha⁻¹ (0.0018 Tm ha⁻¹), mientras que en tierno es de 38 qq ha⁻¹ (0.0038 Tm ha⁻¹) (INEC, 2013). En la provincia de Loja la superficie sembrada de fréjol es de 3 483 ha, de las cuales 1 099 ha son en cultivo solo con una producción de 122 Tm, y en asocio 2 384 ha con una producción de 357 Tm de fréjol tierno (INEC, 2013).

2.2 IMPORTANCIA DE LA FIJACIÓN DE NITRÓGENO

Según (Baca *et al.*, 2000) en climas templados, la fracción de materia orgánica de los suelos denominada humus, constituye una abundante reserva de nitrógeno relativamente estable. El nitrógeno del humus llega a estar disponible para ser incorporado por los organismos vivos sólo tras una lenta mineralización (transformación que no es mediada por microorganismos), proceso que suele demandar décadas o siglos. En las regiones de clima

tropical, en cambio, la temperatura y humedad favorecen el proceso de mineralización.

Entretanto, las bacterias fijadoras de N_2 en vida libre reducen el N_2 a NH_4^+ por medio de una reacción enzimática muy costosa energéticamente y de esta forma incorporan N inorgánico. El NH_4^+ incorporado es asequible para otros grupos bacterianos, que pueden oxidarlo a nitritos (NO_2^-) y nitratos (NO_3^-). Los iones NH_4^+ , NO_2^- y NO_3^- , se combinan para formar sales muy solubles en agua y consecuentemente se distribuyen en la ecósfera en soluciones acuosas, formando pequeños reservorios de reciclado activo. Pero al ser estos compuestos muy importantes para el crecimiento vegetal se agotan rápidamente. (Baca *et al.*, 2000).

Las bacterias fijadoras en simbiosis transforman por medio de la misma reacción el N_2 en NH_4^+ que es incorporado a aminoácidos y ureídos, que en este caso son cedidos a la planta, de la cual obtienen a cambio carbono (C) como nutriente. Esta capacidad de reducir el N_2 se ha explotado en la agricultura realizando biofertilizaciones del cultivo de leguminosas con su par simbiótico. Existen tres formas de incorporación de N_2 a la biósfera: el proceso industrial de Haber-Bosch, en el cual se utilizan altas presiones y temperaturas para transformar el N_2 a NH_4^+ (proceso principalmente empleado para producir fertilizantes), la fijación natural que ocurre como consecuencia de las descargas eléctricas y la fijación biológica de N_2 . (Baca *et al.*, 2000).

El uso de fertilizantes químicos, por ejemplo urea, genera lixiviación, eutrofización de ambientes terrestres y acuáticos, pérdida del ozono estratosférico (Gruber y Galloway, 2008) y consume recursos no renovables. Por ello, es deseable que la incorporación del N ocurra por medio de biofertilizantes, que resultan más económicos y no contaminan el medio ambiente. Entre los biofertilizantes más importantes encontramos a los rizobios. (Baca *et al.*, 2000).

2.2.1 Ciclo del Nitrógeno

El ciclo del nitrógeno en el suelo representa solamente una parte del ciclo total del nitrógeno en la naturaleza. La disponibilidad de este elemento es de gran importancia para las plantas, ya que el 78 % del N se encuentra en el aire, presentándose en forma molecular (N_2) (Paredes, 2013), pero es difícil que los organismos lo asimilen, ya que primero debe ser desdoblado y empezar así la síntesis de aminoácidos, proteínas, ácidos nucleicos (ADN y ARN) y otras moléculas fundamentales para el metabolismo (Salazar y Ordóñez, 2013), ya que, según Castillo *et al.* (2005), En la naturaleza, la mayor parte del nitrógeno disponible se encuentra en forma inorgánica, como amoníaco (NH_3), nitratos (NO_3), o dinitrógeno (N_2).

Los microorganismos, particularmente las bacterias, juegan un importante papel en todas las principales transformaciones del nitrógeno. El ciclo del nitrógeno consta de las siguientes etapas:

- *Fijación:* Consiste en la incorporación del nitrógeno atmosférico a las plantas, gracias a algunos microorganismos, como bacterias y cianobacterias que se encuentran presentes en el suelo y en ambientes acuáticos. Esta fijación se da por medio de la conversión de nitrógeno gaseoso (N_2) en amoníaco (NH_3) o nitratos (NO_3^-) por medio de la enzima *nitrogenasa*. La relación entre *Rhizobium* y su huésped es mutualista: las bacterias reciben carbohidratos elaborados por la planta, y la planta recibe nitrógeno en una forma asimilable (CICEANA, 2007).
- *Nitrificación:* Según Pelczar *et al* (1993), la oxidación del amoníaco a nitritos se llama nitrificación. Esta fase se da en los siguientes pasos: Un grupo de bacterias (*Nitrosomonas* sp. y *Nitrococcus* sp.) oxidan el amoníaco a nitrito (NO_2^-); luego otra bacteria del suelo (*Nitrobacter* sp.) oxida el nitrito en nitrato, por este motivo no se encuentra nitrito en el suelo, que además es tóxico para las plantas. La modificación de NH_4^+ a NO_3^- depende

de la temperatura del suelo; la conversión se da más rápida cuando la temperatura está sobre los 10° C y el pH está entre los 5.5-6.5 (CICEANA, 2007).

- *Asimilación:* La asimilación ocurre cuando las plantas absorben a través de sus raíces, nitrato (NO₃⁻) o amoníaco (NH₃), elementos formados por la fijación de nitrógeno o por la nitrificación. Luego, estas moléculas son incorporadas tanto a las proteínas, como a los ácidos nucleicos de las plantas (Salazar y Ordóñez, 2013).
- *Amonificación:* La amonificación comienza cuando organismos producen desechos que contienen nitrógeno como la urea (orina) y desechos de aves u organismos muertos (Salazar y Ordóñez, 2013) y son degradados a compuestos simples por los organismos que viven en el suelo (bacterias y hongos), llevando a cabo la digestión enzimática por lo que el amonio se degrada a compuestos aminados, como proteasas, peptonas y al final, en aminoácidos. Una vez concluida la etapa, las bacterias fijadoras liberan el exceso de nitrógeno como amoníaco (NH₃) o amonio (NH₄) (Pelczar *et al.*, 1993; Baca *et al.*, 2000).
- *Desnitrificación:* El proceso de desnitrificación consiste en la transformación de los nitratos a nitrógeno gas, en ausencia de oxígeno (Arriechi *et al.*, 2011). Este proceso se denomina desnitrificación y conlleva a pérdidas de nitrógeno en el suelo. Algunos de los microorganismos relacionados en la reacción son *Thiobacillus denitrificans* (autótrofo), *Micrococcus denitrificans* (heterótrofo) y algunas especies de heterótrofos más comunes perteneciente a los géneros *Serratia*, *Pseudomonas*, y *Achromobacter*. La desnitrificación se disminuye en suelos aireados con cantidades moderadas de materia orgánica y nitratos, suelos saturados de agua (anaerobios) y ricos en sustancias orgánicas (Pelczar *et al.*, 1993; Baca *et al.*, 2000).

El hombre también interviene en este ciclo y lo desequilibra a través de la fijación industrial del nitrógeno, por medio de la síntesis de abonos y fertilizantes (Seoánez *et al.*, 2000).

2.3 FIJACIÓN BIOLÓGICA DE NITRÓGENO EN LEGUMINOSAS

Las rizobiáceas son un grupo muy heterogéneo de bacterias que se han dividido en cuatro familias: *Rhizobiaceae*, *Phyllobacteriaceae*, *Hyphomicrobiaceae* y *Bradyrhizobiaceae* (Madigan *et al.*, 2000). Dentro de estas familias sólo unos determinados géneros son capaces de efectuar el proceso de fijación biológica del nitrógeno como el caso de:

Rhizobium, *Sinorhizobium*, *Mesorhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Azorhizobium* y *Allorhizobium*. Con el fin de simplificar la lectura nos referiremos a todos estos géneros como *Rhizobium*.

A diferencia de las cianobacterias y los actinomicetos pertenecientes al género *Frankia*, las rizobiáceas no pueden generar un ambiente anaerobio o microaerobio en donde poder realizar la fijación de nitrógeno por sí mismas. Para llevar a cabo el proceso estas bacterias han de encontrarse en las inmediaciones de plantas de la familia de las fabáceas e interactuar con las mismas, originando una serie de reacciones en la planta que desencadenarán la formación de un órgano mixto nuevo, el nódulo simbiótico, en el cual se proporciona un entorno controlado, así como los nutrientes necesarios para que la bacteria pueda efectuar el proceso de fijación. (FAO, 1995; Burdman *et al.*, 2000; Quintero, 2000).

Antes de llegar a la consecución del nódulo, tanto la planta como la bacteria han de seguir un protocolo, de tal manera que, si cualquiera de ellos incumple alguna de las condiciones establecidas, la formación del nódulo abortará. Dicho protocolo se puede resumir en:

- Intercambio de señales de naturaleza química entre la planta y el microorganismo.

- Activación del ciclo celular en células del córtex e iniciación del nuevo órgano en la planta.
- Infección por parte de la bacteria, formación del canal de infección e invasión de los tejidos recién formados.
- Diferenciación de la bacteria a forma especializada. (FAO, 1995; Burdman *et al.*, 2000; Quintero, 2000).
-

2.4 FIJACIÓN SIMBIÓTICA DE NITRÓGENO

La simbiosis es una de las más importantes interacciones biológicas. Los organismos que participan en ella se benefician mutuamente en situaciones en las que ninguno de ellos podría realizar una función vital o sobrevivir aisladamente (Vance C.P., 2001). Para que una simbiosis tenga lugar, dos o más organismos diferentes deben vivir en inmediata proximidad. Algunas simbiosis microbianas involucran solo a microorganismos, mientras que en otras existen asociaciones de microorganismos con insectos, plantas o animales superiores. (Vance C.P., 2001).

Un ejemplo de simbiosis es la fijación simbiótica de nitrógeno. En ella se establece una relación de este tipo entre bacterias heterótrofas (esto es, que dependen de un sustrato orgánico como principal fuente de carbono) de los géneros *Rhizobium* y *Bradyrhizobium* (denominados colectivamente rhizobios) y plantas leguminosas. Los microorganismos son albergados por raíces o tallos y así logran, mediante sistemas enzimáticos específicos, que el nitrógeno gaseoso (N₂) que no es aprovechable por las plantas se transforme en amonio que puede ser utilizado por ellas. La asociación es mutuamente beneficiosa porque permite que las bacterias obtengan hidratos de carbono del vegetal mientras que este se beneficia incorporando nitrógeno del aire. Esto a su vez impide que el suelo pierda sustancias como el nitrógeno (Vance C.P., 2001).

2.4.1 Fijación Simbiótica de Nitrógeno en Leguminosas

La fijación simbiótica de nitrógeno en los nódulos de las leguminosas es el resultado de una serie de complejas interacciones entre la bacteria y las

raíces de la planta entre las que se distinguen las siguientes etapas, el aumento en el número de los rhizobios que ingresarán a los pelos radiculares de la leguminosa. Esto es posible gracias a sustancias excretadas por las raíces. (Qifu *et al.* 1998).

La adhesión entre las bacterias y las células superficiales de los pelos radiculares de las raíces. Esto ocurre por múltiples mecanismos, en la mayoría de ellos la planta produce proteínas que se unen a los hidratos de carbono de la superficie de las bacterias.

En los primeros pasos de la infección los pelos radiculares se curvan deformándose. De este modo encierran y atrapan los rhizobios que se hubieran adherido a ellos (Qifu *et al.* 1998).

Penetración de las bacterias. Esta se produce a través de la pared de los pelos radiculares mediante la formación de un cordón de infección tubular por donde las bacterias penetran las células de las raíces. (Qifu *et al.* 1998).

Diferenciación de los nódulos radiculares. Una vez que las bacterias han invadido las células radiculares estas últimas proliferan con la consiguiente emergencia de tejido nodular infectado con rhizobios.

La fijación de nitrógeno se produce varios días después de la entrada de las bacterias a las raíces. Al hacerlo las bacterias fijan nitrógeno atmosférico y excreta amoníaco en el citoplasma de la célula el que será utilizado por la planta como fuente para la síntesis de sustancias que contienen nitrógeno. (Qifu *et al.* 1998).

2.5 LOS BIOFERTILIZANTES

La interpretación del término biofertilizante es muy amplia, representando desde microorganismos, abonos verdes y estiércoles, hasta extractos de plantas. De manera sintetizada, podemos decir que son productos que contienen microorganismos, que al ser inoculados pueden vivir asociados o en simbiosis con las plantas y le ayudan a su nutrición y protección (Vessey, 2003). Estos microorganismos se encuentran de forma natural en

el suelo y abarcan diversos grupos; sin embargo, su población es afectada por el manejo de suelo y uso excesivo de agroquímicos (Caballero-Mellado *et al.*, 1992; Grageda Cabrera *et al.*, 2003).

A finales del siglo XIX, la práctica de mezclar suelo con semillas, se convirtió en un método recomendado para inocular leguminosas en Estados Unidos; poco después, Nitragin registró la primer patente para inocular plantas con bacterias del género *Rhizobium* spp. En los años 1930's y 1940's, la inoculación con bacterias rizosféricas asociativas con cepas de los géneros *Azotobacter* y *Bacillus* fue utilizada a gran escala en Rusia y Europa del Este. Sin embargo, estas prácticas no tuvieron éxito y fueron abandonadas durante la Segunda Guerra Mundial (Barea *et al.*, 2005; Bashan, 2008).

Todo apuntaba que el futuro de los biofertilizantes era promisorio en el desarrollo de la agricultura del siglo XX. Sin embargo, la asombrosa industrialización y urbanización que surgió después de 1945, demandó una gran cantidad de materias primas y alimentos. Es aquí donde la demanda de los fertilizantes, que son capaces de generar una rápida respuesta productiva, tuvieron su extensa utilización (Duxbury, 1994). Aunque por casi 100 años se han producido comercialmente inoculantes a base de *Rhizobium* spp., con las crisis energéticas en la década de 1970, el estudio de los biofertilizantes avanzó rápidamente en algunos países europeos y asiáticos; sin embargo, el avance fue menor en México y países latinoamericanos (Okon y Labandera González, 1994).

Actualmente, existe una gran variedad de biofertilizantes con diversas funciones y atendiendo al tipo de cultivo. En general, los biofertilizantes más difundidos se componen de hongos micorrízicos y bacterias (All-Taweil *et al.*, 2009; Pooja *et al.*, 2007).

2.6 USO DE BIOINOCULANTES EN LA AGRICULTURA

La factibilidad del uso de microorganismos como una opción para aumentar la productividad agrícola ha resurgido en virtud de la problemática actual en torno a los precios del petróleo, así como también por el creciente interés por tecnologías para la producción de alimentos libre de pesticidas, compatible con la conservación de los recursos naturales (INIAP 2008).

2.6.1 Efecto de los Bioinoculantes

Entre los defectos directos que ejerce el Bioinoculante en el estado nutrimental de la planta están los siguientes:

- Favorecen el reabastecimiento de los nutrimentos del suelo. La fijación biológica de nitrógeno por cultivo que pertenecen a la familia de las leguminosas, como el fréjol, el garbanzo y las habas es un ejemplo de ello.
- Aumentan la disponibilidad de estos nutrimentos, por ejemplo a través de la solubilización de fosfatos.
- Amplían el acceso de las plantas a estos nutrimentos aumentando el volumen de la raíz o modificando su morfología. Además, algunos bioinoculantes pueden controlar algunos patógenos de las plantas, lo que les confiere un valor agregado.

2.6.2 Ventajas del Uso de Bioinoculantes

La labranza y el uso de fertilizantes, pesticidas y otros químicos reducen la población natural microbiana, limitan la disponibilidad de nutrimentos y son la principal fuente de contaminación en terrenos agrícolas. Los Bioinoculantes constituyen una alternativa viable para reducir costos de producción y el impacto ambiental asociado a la fertilización química (INIAP 2008). Mediante el uso de bioinoculantes es posible incrementar el rendimiento de los cultivos entre 17% y 50%, mejorar la fertilidad y reducir las poblaciones de microorganismos que causan enfermedades en las plantas. Además, los inoculantes microbianos constituyen una tecnología compatible con sistemas de producción agrícola orgánica (INIAP 2008).

2.6.3 Formas de Aplicación

La presentación de los bioinoculantes puede ser líquida o sólida. La forma, el tiempo y la frecuencia de aplicación dependerán del tipo Bioinoculante empleando y del cultivo. Los bioinoculantes sólidos se aplican comúnmente en la semilla antes de la siembra, mientras que los líquidos se pueden aplicar en la semilla, en el suelo, en las plántulas o propágulos al momento de la siembra y en las plantas ya establecidas mediante aspersión por mochilas, o en los sistemas de riego (INIAP 2008).

2.7 IMPORTANCIA DE LOS BIOFERTILIZANTES EN LA AGRICULTURA

Del área total del planeta (510 072 000 km²), la parte acuática representa 71% y la terrestre 29%; de la parte terrestre, sólo 13% se puede utilizar para la producción agrícola. Aun así, el 98% de los alimentos proviene del área agrícola y un 2% de la acuática (FAO, 2002). En los últimos años, la tasa de crecimiento de la producción agrícola ha disminuido; existen tres fuentes principales de crecimiento en la producción de cultivos: aumento de la tierra cultivada, incremento de la frecuencia de las cosechas y aumento de los rendimientos. Hay indicios de que podríamos estar llegando al límite de las posibilidades para las tres fuentes (FAO, 2002).

Entre los años sesenta y noventa, la tierra de cultivo en el mundo sólo creció 11% mientras que la población mundial casi se duplicó. Como resultado, la tierra de cultivo per cápita disminuyó 40%, pasando de 0.43 ha a sólo 0.26 ha. No obstante, a lo largo de este mismo período, los niveles de nutrición mejoraron considerablemente y disminuyó el precio de los alimentos. La explicación es que el crecimiento de la productividad redujo la cantidad de tierra necesaria para producir la misma cantidad de alimentos en un 56%. Esta reducción, facilitada por el aumento del rendimiento e intensidad de cultivos, compensó sobradamente la disminución de superficie per cápita (FAO, 2002).

En las últimas décadas se ha tomado conciencia del agotamiento de los recursos naturales debido a la explotación desmesurada de los mismos. En el ámbito agrícola, el objetivo es lograr altos rendimientos por unidad de superficie para satisfacer la creciente demanda de alimentos, sin considerar la sostenibilidad de la producción (viabilidad técnica, rentabilidad económica y sin contaminación). Los éxitos de esta estrategia han sido importantes, pero es una agricultura muy ineficiente y altamente contaminante, la cual ha ocasionado la pérdida de la diversidad biológica, disminución de los recursos forestales, erosión del suelo, cambios climáticos, (FAO, 2002).

Esta situación ha disminuido la superficie apropiada para la agricultura, causando graves problemas ecológicos, económicos y sociales. Por tal motivo, es necesario encontrar soluciones de producción adecuadas. Las nuevas tecnologías deben estar orientadas a mantener la sostenibilidad del sistema mediante la explotación racional de los recursos naturales y aplicación de medidas adecuadas para preservar el ambiente (FAO, 2002). Uno de los requerimientos más importantes es el mantenimiento de la fertilidad del suelo. Tradicionalmente, la deficiencia de nutrientes, especialmente la de N, es corregida a través de la adición de fertilizantes. Sin embargo, los altos costos limitan su uso, sobre todo en los países en desarrollo, donde la necesidad de incrementar la producción de alimentos es más urgente.

La importancia que tienen los microorganismos en la naturaleza y en sus relaciones con el hombre es cada día más evidente. Cuando la agricultura tiene la necesidad de adoptar medidas conservacionistas, los microorganismos utilizados como biofertilizantes tienen un papel sustancial. El desarrollo y uso de los biofertilizantes se contempla como una importante alternativa para la sustitución parcial o total de los fertilizantes minerales (FAO, 2002).

Los beneficios que presenta el uso de microorganismos en la agricultura pueden concretarse de la siguiente manera: a) Fitoestimulantes, estimulan la germinación de las semillas y el enraizamiento por la producción de reguladores del crecimiento, vitaminas y otras sustancias; b) Biofertilizantes, incrementan el suministro de los nutrimentos por su acción sobre los ciclos biogeoquímicos, tales como la fijación de N₂, la solubilización de elementos minerales o la mineralización de compuestos orgánicos; c) Mejoradores, mejoran la estructura del suelo por su contribución a la formación de agregados estables; d) Agentes de control biológico de patógenos, desarrollan fenómenos de antagonismo microbio-microbio; e) Biorremediadores, eliminan productos xenobióticos tales como pesticidas, herbicidas y fungicidas; y f) Mejoradores ecofisiológicos, incrementan la resistencia al estrés tanto biótico como abiótico (Bowen y Rovira, 1999).

2.8 LOS BIOFERTILIZANTES

La interpretación del término biofertilizante es muy amplia, representando desde microorganismos, abonos verdes y estiércoles, hasta extractos de plantas. De manera sintetizada, podemos decir que son productos que contienen microorganismos, que al ser inoculados pueden vivir asociados o en simbiosis con las plantas y le ayudan a su nutrición y protección (Vessey, 2003). Estos microorganismos se encuentran de forma natural en el suelo y abarcan diversos grupos; sin embargo, su población es afectada por el manejo de suelo y uso excesivo de agroquímicos (Caballero-Mellado et al., 1992; Grageda Cabrera *et al.*, 2003).

A finales del siglo XIX, la práctica de mezclar suelo con semillas, se convirtió en un método recomendado para inocular leguminosas en Estados Unidos; poco después, Nitragin registró la primer patente para inocular plantas con bacterias del género *Rhizobium* spp. En los años 1930's y 1940's, la inoculación con bacterias rizosféricas asociativas con cepas de los géneros *Azotobacter* y *Bacillus* fue utilizada a gran escala en

Rusia y Europa del Este. Sin embargo, estas prácticas no tuvieron éxito y fueron abandonadas durante la Segunda Guerra Mundial (Barea *et al.*, 2005; Bashan, 2008).

Todo apuntaba que el futuro de los biofertilizantes era promisorio en el desarrollo de la agricultura del siglo XX. Sin embargo, la asombrosa industrialización y urbanización que surgió después de 1945, demandó una gran cantidad de materias primas y alimentos. Es aquí donde la demanda de los fertilizantes, que son capaces de generar una rápida respuesta productiva, tuvieron su extensa utilización (Duxbury, 1994). Aunque por casi 100 años se han producido comercialmente inoculantes a base de *Rhizobium* spp., con las crisis energéticas en la década de 1970, el estudio de los biofertilizantes avanzó rápidamente en algunos países europeos y asiáticos; sin embargo, el avance fue menor en México y países latinoamericanos (Okon y Labandera González, 1994).

Actualmente, existe una gran variedad de biofertilizantes con diversas funciones y atendiendo al tipo de cultivo. En general, los biofertilizantes más difundidos se componen de hongos micorrízicos y bacterias (All-Taweil *et al.*, 2009; Pooja *et al.*, 2007).

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 UBICACIÓN GENERAL

El presente trabajo se llevó a cabo en dos fases experimentales para dar respuesta a los objetivos de la presente investigación, la primera fase de experimentación a nivel de campo tuvo lugar en una finca particular ubicada en el sector San José, cantón Catamayo donde se evaluaron los parámetros morfológicos y rendimiento del cultivo frejol bola 60, en inoculación con el Bioinoculante RIZOSUR. La segunda fase se llevó a cabo en el Laboratorio de Microbiología Vegetal del Centro de Biotecnología y Laboratorio de Suelos y Bromatología de la Universidad Nacional de Loja, donde se determinó la población microbiana: bacterias, hongos y actinomicetos del suelo antes y después de la experimentación en campo, así como los análisis de suelo y N total.

3.1.1 Ubicación Política y Geográfica

El Sector San José, se encuentra ubicado al sur del país, Cantón Catamayo perteneciente a la provincia de Loja con las siguientes coordenadas geográficas.

Latitud: 04° 50' 00" S

Longitud: 79° 30' 00" W

Altitud: 1232 msnm

El laboratorio de Microbiología Vegetal del Centro de Biotecnología se encuentra ubicado al sur de la ciudad de Loja, cantón y provincia del mismo nombre. En las siguientes coordenadas geográficas.

Latitud: 04° 08' 00" S

Longitud: 79° 12' 00" W

Altitud: 2134 msnm

3.2 MATERIALES

3.2.1 Materiales, equipos y reactivos utilizados para la fase de laboratorio

Destilador de agua, Agitador calentador, Autoclave, Cámara de flujo laminar, Incubadora, Incubadora con agitación, Balanza analítica, Contador de colonias, Centrifuga, Vortex, Micropipetas (1000 ul), Puntas de micropipetas (1000 ul), Papel lumínico, Enlermeyer, Matraces, Beakers, Cajas de Petri, Agar Nutriente, Agar-Agar, Extracto de levadura, Manitol, Cloruro de Sodio, Triptona, Desinfectantes de laboratorio.

3.2.2 Materiales para la fase de campo

Semilla, Insumos agrícolas, Bioinoculante, Etiquetas, Cámara fotográfica, Lampas, Azadones.

3.3 METODOLOGÍA

3.3.1 Metodología para el primer objetivo

“Evaluar el efecto del bioinoculante sobre parámetros de nodulación, biomasa, componentes de rendimiento, porcentaje de N total y rendimiento agrícola de la variedad bola 60 en condiciones de campo”

Realización del experimento

El montaje del experimento en condiciones de campo se realizó en el sector San José-Catamayo, empleando la variedad fréjol bola 60, mediante la aplicación de un diseño experimental de bloques al azar con 4 réplicas por tratamiento. Cada uno de los ensayos tuvo un área de 25 m² (5*5 m), con una distancia de 2 m entre parcelas y 1 m entre réplicas. Al tratamiento con la inoculación del Bioinoculante, se adicioneo el tratamiento Control fertilización (testigo). En todo el desarrollo del cultivo se realizaron monitoreos constantes en las labores agrotécnicas de irrigación, deshierbas, manejo de plagas y enfermedades.

Peletización de las semillas de frejol

La peletización del Bioinoculante RIZOSUR en las semillas de frejol se realizó bajo la sombra, en un balde se mezcló la cantidad necesaria de agua con los 0,015 kg de azúcar para formar una pasta y en este depositar los 2 kg de semilla y los 0,5 kg del Bioinoculante, para luego homogenizar todos los componentes y poner a secar por el tiempo de dos horas, al cabo de este tiempo se realizó la siembra respectiva a chorro continuo (Torres-Gutiérrez, 2008).

Evaluaciones del cultivo

A los 8 días después de la siembra (DDS), se realizó la evaluación de los parámetros morfológicos: altura (cm) y el número de hojas de las plantas. Estos parámetros de evaluación se continuaron a los 15 y 21 días respectivamente. A los 30 y 60 días (DDS), se evaluó los parámetros de nodulación: número de nódulos totales (NN) y peso fresco y seco de los nódulos (PFN, PSN) y los parámetros de biomasa: peso fresco y seco de la raíz (PFR, PSR) y peso fresco y seco del follaje (PFF, PSF). Para estas evaluaciones se tomaron como muestra 5 plantas por parcela y tratamiento, de igual manera para los componentes de rendimiento, en las cuales se evaluaron: número de vainas por planta, peso de vainas por planta y número de granos por vaina y para determinar el rendimiento agrícola se seleccionaron 40 plantas por parcela (Torres-Gutiérrez, 2008). Al final de las evaluaciones se calculó el contenido de N total de las semillas. Este análisis se realizó mediante el método de Kjeldahl (Herrera *et al.*, 1980).

3.3.2 Metodología para el segundo objetivo

“Determinar la influencia de la aplicación del Bioinoculante sobre las propiedades físicas, químicas y microbiológicas del suelo en el área de experimentación”

Para la realización de este objetivo se tomaron muestras de suelo antes y después de la experimentación. Para evaluar las características físicas y químicas del suelo, se tomaron muestras a una profundidad de 20 cm de

cada una de las réplicas, seguidamente se mezclaron todas las muestras con el fin de obtener una muestra homogénea de 1 kg. Obtenidas las muestras estas se secaron por un período de 72 horas para posteriormente realizar el tamizado de las mismas; este procedimiento consistió en pasar la muestra por dos tamices, el primero útil para eliminar el material más grueso (terrones) y el segundo tamizado para recolectar el material que se utilizó para el análisis de macro y micro elementos, conductividad eléctrica, pH, y clase textural.

Análisis físicos y químicos del suelo

Para el análisis físico del suelo se valoró mediante técnicas de laboratorio tomando en cuenta los siguientes parámetros: Tipo y subtipo de suelo, textura, estructura, coeficiente de permeabilidad y porosidad. Mientras que para el análisis químico del suelo fueron: pH, conductividad eléctrica (CE), porcentaje de nitrógeno, fósforo, potasio, calcio, magnesio, hierro, cobre, manganeso y zinc. Todos estos análisis se realizaron en el laboratorio de suelos de la Universidad Nacional de Loja (UNL).

Análisis microbiológicos

Los análisis microbiológicos de suelo se realizaron en el Centro de Biotecnología de la UNL. Para el efecto se cuantificaron en Unidades Formadoras de Colonias (UFC) bacterias, hongos y actinomicetos, mediante la siembra en medios de cultivo generales y a partir de las diluciones seriadas desde 10^{-1} a 10^{-7} . Para el análisis de las bacterias se utilizó el medio de cultivo Agar Nutriente. Para la cuantificación de los hongos se utilizó el medio de cultivo PDA (papa, dextrosa, agar). Finalmente en el medio de cultivo Agar caseína se cuantificó el crecimiento de actinomicetos. Para bacterias y actinomicetos se inoculó a partir de la dilución 10^{-5} a 10^{-7} y para hongos desde la dilución 10^{-3} a 10^{-5} , en todos los casos se realizó cuatro replicas por dilución y se cuantificó la población microbiana a partir de las 72 horas en UFC ml⁻¹ (Mayea, 1998).

3.3.3 Metodología para el tercer objetivo

“Realizar un análisis de beneficio-costo de la aplicación del bioinoculante frente a la fertilización química”

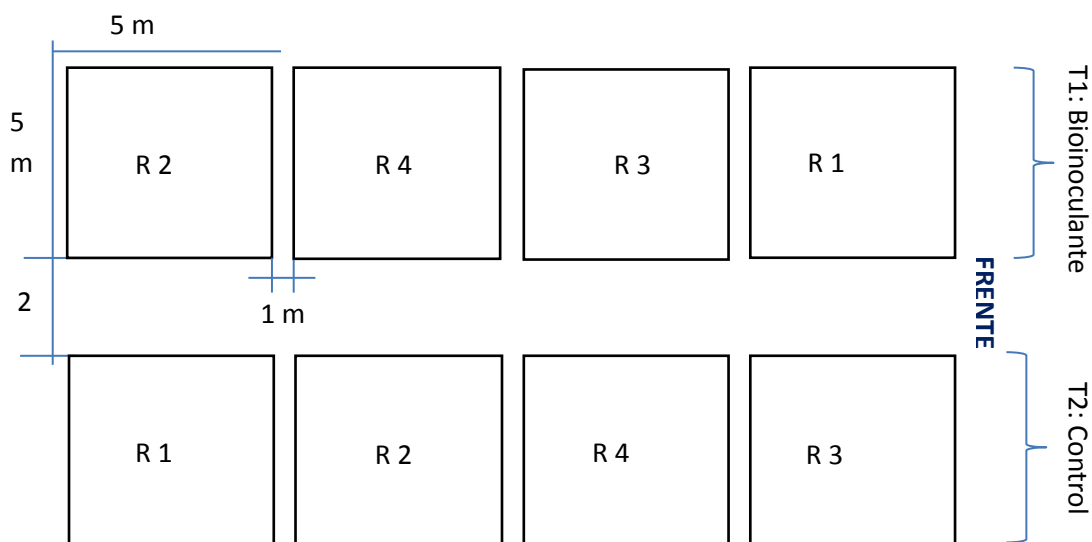
Mediante este objetivo se determinó el comportamiento económico de la utilización de inoculantes biológicos en fréjol en comparación con la fertilización química. Para el efecto se siguió la metodología propuesta por el Centro Internacional de Mejoramiento de Maíz y Trigo (CIMMYT, 1998), donde se tuvo en cuenta el presupuesto parcial, precios de campo, costos de campo y análisis marginal como puntos básicos.

El análisis se llevó a cabo con los valores promedios ajustados de los rendimientos, costos e ingresos obtenidos según tratamientos a través de todo el ciclo del cultivo. El análisis de dominancia se estableció en la técnica de presupuesto parcial, por lo que para obtener el costo variable únicamente se incluyeron aquellos costos que variaron entre tratamientos, es decir, mano de obra para aplicar el fertilizante y el bioinoculante; también el costo de los insumos (bioinoculante y fertilizante). El beneficio neto constituyó por lo tanto la diferencia entre los ingresos totales y los costos variables totales. La tasa marginal de retorno se calculó con base en el coeficiente obtenido de la diferencia del beneficio neto y el costo variable entre tratamientos de un beneficio neto inferior a otro mayor.

- **DISEÑO EXPERIMENTAL**

El experimento en condiciones de campo se realizó utilizando un diseño experimental de bloques al azar con 4 réplicas por cada tratamiento.

a) Esquema del Ensayo



- **ANÁLISIS ESTADÍSTICO**

Los datos obtenidos se procesaron utilizándose el paquete SPSS v.22 IBM para Windows. Para determinar las diferencias estadísticas entre los tratamientos y la interacción de estos factores en los parámetros de fijación biológica del N y la biomasa de las plantas, se realizó un análisis de varianza simple (One Way ANOVA), donde se determinó el grado de independencia de los tratamientos y el genotipo evaluado, utilizándose la prueba paramétrica de Tukey HSD con nivel de significación $p < 0.05$.

4. RESULTADOS

4.1 EFECTO DEL BIOINOCULANTE SOBRE PARÁMETROS MORFOLÓGICOS, NODULACIÓN, BIOMASA, COMPONENTES DE RENDIMIENTO, PORCENTAJE DE (N) TOTAL Y RENDIMIENTO AGRÍCOLA DE LA VARIEDAD BOLA 60 EN CONDICIONES DE CAMPO.

4.1.1 Características morfológicas

En el cuadro 1, se presentan los resultados correspondientes a los parámetros morfológicos a los 8, 15 y 21 días después de la siembra (DDS). Los mejores resultados en todos los tiempos de evaluación corresponden a la inoculación con el Bioinoculante.

Cuadro 1. Evaluación de parámetros morfológicos de la variedad frejol bola 60

TRATAMIENTOS	8 DDS		15 DDS		21 DDS	
	Altura (cm)	Nº Hojas	Altura (cm)	Nº Hojas	Altura (cm)	Nº Hojas
T1 (Bioinoculante)	5,55 ^a	4,49 ^a	12,05 ^a	5,45 ^a	16,55 ^a	5,85 ^a
T2 (Control)	3,9 ^b	3,4 ^b	9,4 ^b	5,15 ^a	10,5 ^b	4,4 ^b
Error estándar	0,28*	0,19*	0,79*	0,19*	0,95*	0,30*

Letras desiguales en la columna difieren para $p < 0,05$ por Tukey. (*) error estándar

4.1.2 Parámetros de nodulación

En la figura 1, se muestran los resultados obtenidos con respecto al número de nódulos totales para la variedad frejol bola 60. El tratamiento con la inoculación del Bioinoculante presenta los mejores resultados con 10,50 nódulos y 4,85 con respecto al Control.

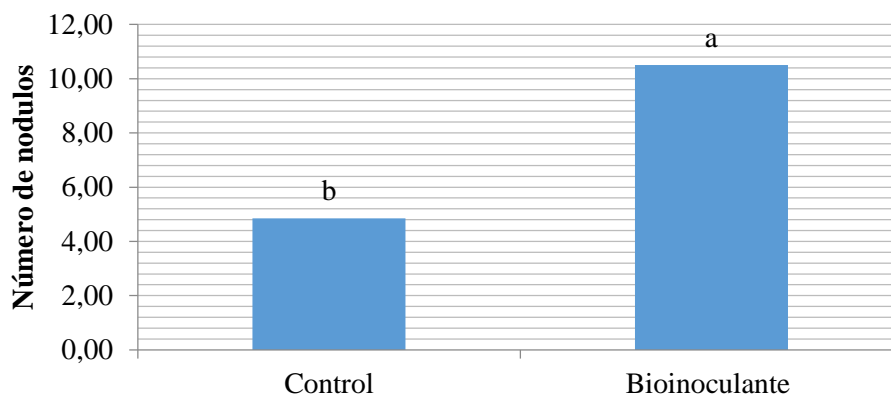


Figura 1. Número de nódulos totales de la variedad frejol bola 60. Tratamientos: Control y Bioinoculante RIZOSUR. Letras desiguales en las columnas difieren para $p < 0,05$ Tukey.

En la figura 2, se presentan los resultados de PFN y PSN. A pesar que los valores obtenidos con el tratamiento Bioinoculante son superiores al compararlos con el Control, no se evidencia diferencias estadísticas significativas entre los tratamientos para ambas variables evaluadas.

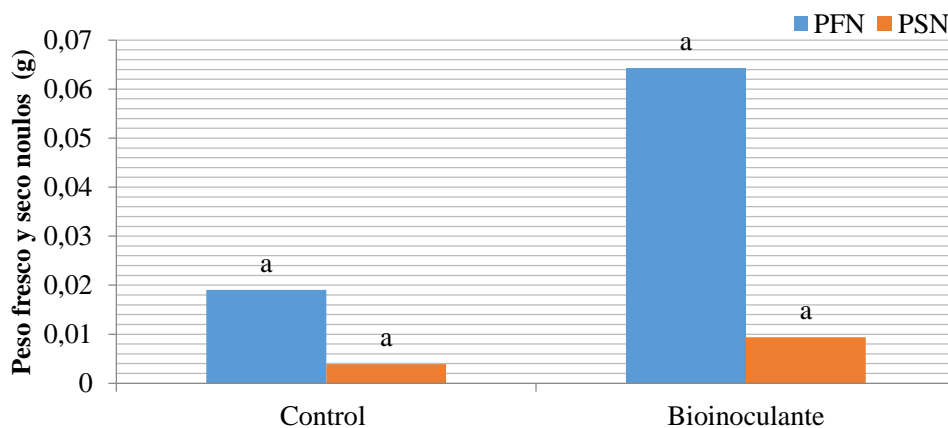


Figura 2. Peso fresco y seco de nódulos (PFN y PSN) en la variedad frejol bola 60. Tratamientos: Control y Bioinoculante RIZOSUR. Letras desiguales en las columnas difieren para $p < 0,05$ Tukey.

4.1.3 Determinación de la biomasa en frejol variedad bola 60

En la figura 3, se muestran los valores para el PFF y PSF. Para ambas variables evaluadas los mejores resultados se obtienen con la inoculación

del Bioinoculante, mientras que el tratamiento Control en todos los casos presentó los valores más bajos.

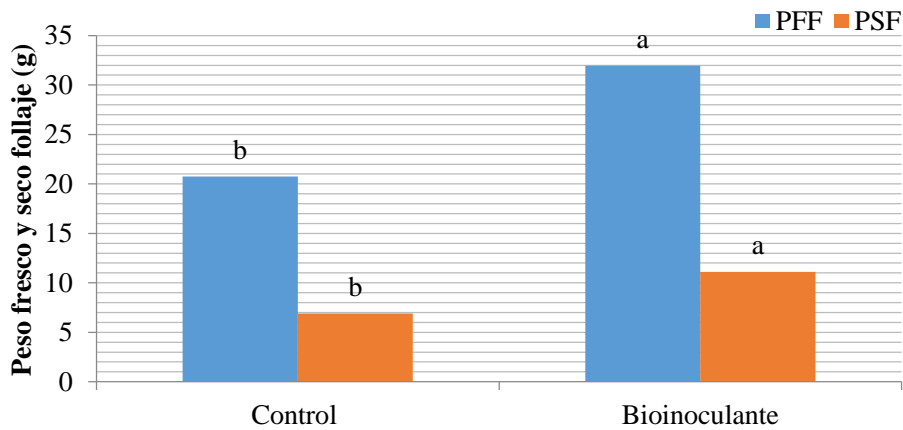


Figura 3. Peso fresco y seco del follaje en la variedad de frejol bola 60. Tratamientos: Control y Bioinoculante RIZOSUR. Letras desiguales en las columnas difieren para $p < 0,05$ Tukey.

En la figura 4, se muestran los resultados para el PFR y PSR. A pesar que los valores medios para el tratamiento Bioinoculante son mejores que el tratamiento Control, no se evidencia diferencia estadísticas significativa entre los tratamientos evaluados con respecto a las variables peso fresco y peso seco de la raíz.

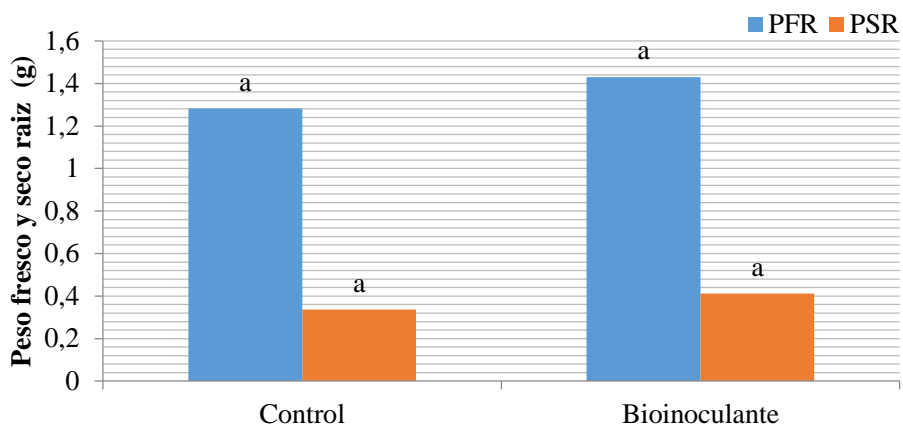


Figura 4. Peso fresco y peso seco de la raíz (PFR y PSR) en la variedad de frejol bola 60. Tratamientos: Control y Bioinoculante RIZOSUR. Letras desiguales en las columnas difieren para $p < 0,05$ Tukey

4.1.4 Componentes del Rendimiento

En el cuadro 2, se presentan los valores estadísticos para los componentes de rendimiento (NVP, PVP, NGV, NGP y RDTO), en el NVP se evidencia diferencias significativas entre el tratamiento Bioinoculante y el Control, con valores promedios de 11,6 y 5,85 respectivamente, siendo el tratamiento con el Bioinoculante el de mejores resultados.

Cuadro 2. Componentes de rendimiento de la variedad Bola 60.

TRATAMIENTOS	NVP	PVP	NGV	NGP	RDTO Total (TM ha ⁻¹)
T1 (Control)	5,85 ^b	28,5 ^b	3,76 ^b	27,3 ^b	4,60 ^b
T2 (Bioinoculante)	11,6 ^a	55,92 ^a	5,15 ^a	41,45 ^a	6,92 ^a
Error estándar	5,78*	27,41*	1,39*	14,15*	2,32*

Letras desiguales en la columna difieren para $p < 0,05$ por Tukey. (*) Error estándar. Tratamientos: Control y Bioinoculante RIZOSUR. Abreviaturas. NVP: número de vainas por planta; PVP: peso de vainas por planta; NGV: número de granos por vaina; NGP: número de granos por planta y RDTO: rendimiento total.

Para el PVP, se evidencia diferencias estadísticas significativas entre el tratamiento Bioinoculante frente al Control con 55,92 y 28,50 g respectivamente, de igual manera para la variable NGP el tratamiento Bioinoculante influye significativamente con respecto al Control. Mientras que para la variable NGV ningún de los tratamientos difieren estadísticamente entre sí. En ambos casos el tratamiento Control presentó los valores más bajos. Para el rendimiento total, es evidente el efecto positivo con la inoculación del Bioinoculante sobre frejol común variedad bola 60, los resultados de 6,92 t ha⁻¹ son altamente significativos en peso fresco frente al Control.

4.1.5 Contenido total de nitrógeno

El contenido de nitrógeno total se presenta en la figura 5. Los valores analizados corresponden al porcentaje % en grano fresco y seco. Se destaca los valores medios con el tratamiento Bioinoculante en

comparación con el tratamiento Control. La diferencia de fijación de N para el tratamiento con el Bioinoculante frente al control es de 14,6 %.

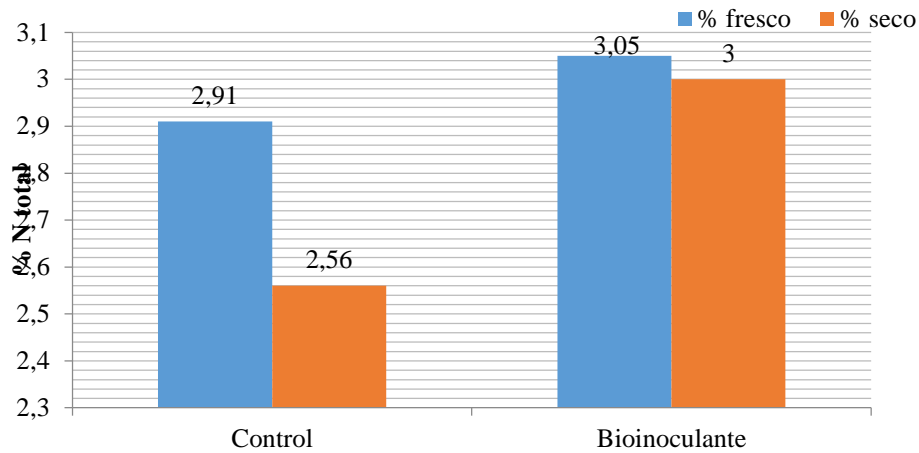


Figura 5. Porcentaje (%) de nitrógeno total fijado por cada tratamiento en semilla en fresco y seco. Tratamientos: Control y Bioinoculante RIZOSUR.

4.2 DETERMINAR LA INFLUENCIA DE LA APLICACIÓN DEL BIOINOCULANTE SOBRE LAS PROPIEDADES FÍSICAS, QUÍMICAS Y MICROBIOLÓGICAS DEL SUELO EN EL SECTOR DE LA EXPERIMENTACIÓN.

4.2.1 Propiedades Físicas del suelo

Los análisis correspondientes a las propiedades físicas del suelo determinaron que la aplicación del Bioinoculante no influyó en la Textura del suelo en la zona de experimentación, ya que los análisis de suelo antes y después de la siembra confirman la misma textura inicial (Franco-Arcillosa).

4.2.2 Propiedades Químicas del suelo

En cuanto a las propiedades químicas, se determinó que la aplicación del Bioinoculante influyó positivamente sobre el suelo. El % de MO pasó de 3,29 a 5,11 y el N de 59,31 se incrementó a 64,46 ppm. Los análisis

completos se adjuntan en Anexos, con toda la información correspondiente a pH, CE, MO, N-P-K, y micro elementos (Ca, Mg, Fe, Mn, Cu, Zn).

4.2.3 Evaluación Microbiológica

En el cuadro 3, se presenta los resultados en unidades formadoras de colonias (UFC) por cada gramo de suelo tanto de bacterias, hongos y actinomicetos. Para bacterias en el primer análisis de suelo se obtienen $1,75 \text{ e}+08 \text{ UFC g s}^{-1}$ y con la aplicación del Bioinoculante este valor se ve incrementado a $1,06 \text{ e}+10$.

Cuadro 3. Unidades formadoras de colonias en los análisis de suelo realizados en el lugar del experimento.

GRUPO MICROBIANO	TRATAMIENTO	ANALISIS 1	ANALISIS 2
Bacterias	Bioinoculante	$1,75 \text{ e}+08$	$1,06 \text{ e}+10$
	Control		$2,72 \text{ e}+09$
Hongos	Bioinoculante	$2,72 \text{ e}+07$	$3,25 \text{ e}+06$
	Control		$3,50 \text{ e}+06$
Actinomicetos	Bioinoculante	$5,75 \text{ e}+07$	$3,30 \text{ e}+07$
	Control		$3,60 \text{ e}+07$

Análisis 1: suelo antes de la siembra; Análisis 2: suelo después de la siembra

Para hongos se determinó un total de $2,72 \text{ e}+07 \text{ UFC g s}^{-1}$ antes de la siembra y una disminución considerable al final del experimento con $3,25 \text{ e}+06 \text{ UFC g s}^{-1}$. Valores similares se obtuvieron en el análisis de actinomicetos con $5,75 \text{ e}+07$ antes del ensayo y $3,30 \text{ e}+07 \text{ UFC g s}^{-1}$ al final.

4.3 ANÁLISIS DE BENEFICIO-COSTO DE LA APLICACIÓN DEL BIOINOCULANTE FRENTE A LA FERTILIZACIÓN QUÍMICA

Los valores obtenidos de los 400 m^2 en la zona de experimentación fueron extrapolados para una hectárea tomando en cuenta los costos fijos y variables de los tratamientos. Para determinar la relación beneficio costo, se partió de los ingresos por la producción y de los costos totales de la misma. Como se detalla en la tabla 4, los mayores ingresos producto de las

ventas se obtuvieron con la aplicación del bioinoculante, el cual tuvo un total de 10,380.00 USD, mientras que con la aplicación de fertilizantes minerales se obtuvo 6,900.00 USD de ingresos.

Cuadro 4. Ingresos por tratamiento de la variedad fréjol bola 60

Tratamiento	Producción (kg ha⁻¹)	Precio venta (USD Kg⁻¹)	Ingreso Total (USD)
Fertilizado	4600,00	1,50	6900,00
Bioinoculante RIZOSUR	6920,00	1,50	10380,00

La utilidad neta mediante las ventas favoreció a la aplicación del producto biológico, teniendo una diferencia de 3,480.00 USD en comparación con la aplicación de Urea para el área analizada (400 m²).

Se destaca que en este análisis no se tomó en cuenta el incremento de la producción que se puede obtener con la aplicación del Bioinoculante, sino que solamente se analiza la producción obtenida en el ensayo.

En la tabla 5, se observa la dominancia de los tratamientos empleados en la presente investigación, evidenciándose que el beneficio neto del tratamiento Bioinoculante con respecto al Control es de 176 %.

Cuadro 5 Análisis de dominancia de la rentabilidad en el cultivo de frejol bola 60

Tratamiento	Costo de producción ha⁻¹	Ingreso Total (USD)	Beneficio Neto (USD)
Fertilizado	1768,82	6900,00	5131,18
Bioinoculante RIZOSUR	1302,27	10380,00	9077,73

En el cuadro 6, se presenta la Tasa Marginal de Retorno la misma de un 845 % con el tratamiento Bioinoculante.

Cuadro 6 Análisis marginal de la aplicación del Bioinoculante con respecto a la fertilización química.

Tratamiento	Total Costos producción (USD)	Costos Marginales (USD)	Beneficio Neto (USD)	Beneficio Marginal (USD)	Tasa Marginal de Retorno (%)	Beneficio o/ Costo
Fertilizado	1768,82		5131,18			2,901
RIZOSUR	1302,27	466,55	9077,73	3946,55	845,9	6,971

En cuanto al índice de la relación B/C, el mayor beneficio se obtiene con el tratamiento Bioinoculante con 6,97 USD y para el Control de 2,90 USD. Como se evidencia, en los dos casos se obtienen ganancias, sin embargo el tratamiento con el Bioinoculante es el más rentable ya que por cada dólar invertido se obtiene una ganancia de 5,97 USD por cada campaña de siembra. En cuanto a la rentabilidad marginal obtenida con el Bioinoculante es de 845,9 % con relación a la fertilización química.

5. DISCUSIONES

En cuanto a los parámetros de nodulación se observó que el Bioinoculante tuvo una influencia positiva en las plantas inoculadas, es decir, que hubo una interacción beneficiosa Bioinoculante a base de bacterias de *Rhizobium* con la leguminosa frejol bola 60, lo cual se evidencio con los valores encontrados en el análisis de varianza para el número de nódulos (NN). El tratamiento Bioinoculante presentó mayor número de nódulos totales (35 nódulos planta⁻¹), con respecto al Control, similares resultados reportan González *et al.*, (2012) y Cayo *et al.*, (2004) los cuales registraron valores promedio de 8,31 y 24-94 nódulos planta⁻¹ respectivamente.

Para el peso fresco y seco de los nódulos los valores medios obtenidos son significativos con el tratamiento Bioinoculante, a pesar de ello no se evidencia diferencias estadísticas con el tratamiento Control. Similares resultados reporta Brunet (1999), que todas las cepas probadas presentaron buena infección en la variedad de fréjol utilizada, el cual se evidenció con el incremento del PFN y PSN conforme avanza la edad de la planta, lo que indica la efectividad de las cepas estudiadas. Subía (2001) corrobora que el desarrollo nodular y por ende el PSN y el PFN dependen tanto de la cepa inoculada como de la variedad del hospedero, evento que pudo estar de manifiesto en nuestra investigación, por un lado se puede ver la interacción beneficiosa bacteria-leguminosa en la formación de nódulos y por otro la obtención de valores altos en el peso seco de nódulos en los dos tratamientos evaluados.

En cuanto a los parámetros de biomasa, tanto para el PFF y PSF el mejor tratamiento se obtiene con la aplicación del Bioinoculante con valores promedio de 31,95 y 11,11g respectivamente, estos valores significativos puede relacionarse con la disponibilidad de nitrógeno en el suelo dada por la acción de las bacterias, lo que ocasionó plantas vigorosas con gran cantidad de follaje. Sierra *et al.*, (2012) concuerda que al emplear cepas aisladas de *Rhizobium* en fréjol determinó que de acuerdo al análisis de varianza realizado, existió una diferencia significativa en el incremento de la biomasa foliar con respecto al tratamiento con adición de N y el tratamiento que no

recibió la aplicación de nitrógeno. Mientras que para el peso fresco y seco de la raíz (PFR-PSR) no existieron diferencias estadísticas entre los tratamientos evaluados, evento que pudo estar dado por una mayor asimilación de nutrientes hacia la parte foliar por parte de las bacterias y no así hacia la raíz.

En cuanto a los componentes de rendimiento. Para el número de vainas por planta (NVP) y peso de vainas por planta (PVP), los mejores resultados se obtienen con la aplicación del Bioinoculante, el mismo que ejerce un efecto positivo en un mayor número de vainas y peso respectivamente con respecto al Control, siendo esta diferencia de un 50% para ambas variables evaluadas. Estos valores significativos pueden estar dados por la optimización de las bacterias diazotróficas como *Rhizobium* en la fijación de N₂ y absorción de otros elementos nutritivos que estimulan el desarrollo vegetal y por ende sus componentes de rendimiento como en el caso del frejol (Valdivia, 2011).

Para la variable número de granos por planta (NGP) los valores obtenidos son significativos con la aplicación del Bioinoculante con respecto al Control, es evidente el efecto del Bioinoculante en la formación de un mayor número de granos por planta, y no así con el número de granos por vaina. El número de granos por planta son los componentes del rendimiento más estables y están más relacionados con las características propias del cultivar (Gutiérrez-Rodríguez *et al.*, 2004) caso que se puso de manifiesto en nuestra investigación.

Los valores más altos en cuanto al rendimiento agrícola se obtuvieron con el tratamiento Bioinoculante con un promedio de 6,92 t ha⁻¹, mientras que con el tratamiento Control 4,59 t ha⁻¹. Ávila-Serrano *et al.*, (2005), reporta que en cuanto al rendimiento, no todas las cepas de *Rhizobium* son capaces de producir una fijación efectiva y mostrar habilidades para nodular; por lo que, mientras mayor sea el número de nódulos, habrá mayor uso del nitrógeno atmosférico presente en el suelo y por ende influirá en la producción de biomasa y producción de grano (rendimiento). En nuestra

investigación se pudo corroborar que los parámetros antes mencionados influenciaron positivamente en mayor biomasa y rendimiento. Según ESPAC (2013), la producción media nacional de fréjol fresco es de 5,1 toneladas métricas por hectárea, que al comparar con el rendimiento obtenido en nuestra investigación, los valores son superiores con un 26 %.

Los valores del porcentaje de nitrógeno total se ven incrementados con la aplicación del Bioinoculante en 3,05 y 3% tanto en masa fresca y seca respectivamente. Las diferencias en porcentaje de fijación de N₂ con respecto al control son de 5 y 14 %. Según (Ochoa y Ruilova, 2014) El porcentaje de nitrógeno total y proteína bruta se lo realizó en grano, el mismo que no presentó diferencias significativas para ambas variedades, es importante tomar en cuenta que esta variable permite determinar si hubo el efecto o no de las cepas de *Rhizobium* inoculadas en fréjol rojo y fréjol negro.

Las propiedades físicas del suelo no cambiaron con la aplicación del bioinoculante, ya que la textura franco-arcillosa se mantuvo tanto al inicio como al final de la experimentación. En cuanto a las propiedades químicas la aplicación del bioinoculante influyo positivamente en las condiciones del suelo, ya que se incrementó el N, K y Ca. (Ochoa y Ruilova, 2014) Mencionan que en cuanto al análisis físico, químico y microbiológico, correspondiente al tercer objetivo de su investigación, no evidenciaron la influencia de *Rhizobium* sobre las propiedades físicas del suelo, ya que los valores obtenidos en los análisis se mantuvieron estables y por lo tanto no hubo variabilidad en cuanto a las propiedades analizadas. Se puede señalar que el uso de microorganismos diazotróficos como es el caso de *Rhizobium*, no modifican las características físicas del suelo, por el contrario, la capacidad de estas bacterias para desarrollar eficientemente el proceso de FBN depende del suelo en el cual se desarrolla.

Los resultados obtenidos con respecto al análisis microbiológico muestran un efecto positivo en la carga microbiana para bacterias después de la terminación del ensayo, la misma incrementándose significativamente de

1,75 e+08 a 1,06 e+10. Sin embargo, esto no sucede para hongos y actinomicetos, los cuales se ven disminuidos después de la experimentación. Según (Ochoa y Ruilova, 2014) El análisis microbiológico, muestran un efecto positivo, en el cual podemos determinar que en cuanto al número de UFC de bacterias, se observa un incremento en el segundo análisis de $2,75 \times 10^9$ UFC en fréjol negro y en fréjol rojo un incrementó de $2,95 \times 10^9$ UFC, lo que beneficia a los procesos bioquímicos adicionales que se encuentran asociados con otros microorganismos presentes en el suelo.

En cuanto al análisis económico se reporta una tasa marginal de retorno para el tratamiento Bioinoculante de 845,90 % con correlación al Control. Esta relación de beneficio neto marginal con los costos marginales/tratamiento, demuestra que el productor accederá a utilizar el Bioinoculante, ya que por cada 1,0 USD invertido en este producto biológico, hay un margen de utilidad de 8,45 USD. En cuanto al beneficio-coste (B/C), el mejor tratamiento corresponde al Bioinoculante con 6,97; frente al Control con 2,90 USD, estos valores se atribuyen a que en el tratamiento con el Bioinoculante presentó mayor rendimiento y por ende mayores ingresos.

6. CONCLUSIONES

De los resultados obtenidos en la presente investigación podemos llegar a las siguientes conclusiones:

- En todos los procesos de evaluación, el bioinoculante influyo significativamente en el incremento de nódulos, biomasa y rendimiento agrícola para la variedad frejol bola 60.
- Los valores de fijación de N_2 en las plantas de frejol fue significativa con 3,05 y 3 % respectivamente en masa fresca y seca.
- El bioinoculante en la zona de experimentación influyo positivamente en las condiciones del suelo ya que incremento en el contenido de N, k y Ca en el suelo.
- El beneficio neto con el tratamiento bioinoculante fue de a 6,97 USD y mientras que con respecto al fertilización química fue de 2,90 USD.

7. RECOMENDACIONES

- Dada la importancia del cultivo para los agricultores de esta zona, es trascendental seguir realizando investigaciones sobre este tema, con el fin de seguir validando este producto biológico, no solo en la parte económica, rendimientos, sino también en la parte ambiental, como alternativa frente a la utilización desmedida de fertilizantes químicos.

8. BIBLIOGRAFÍA

- ÁVILA-SERRANO, N.; MURILLO-AMADOR, B. *et al.* 2005. *Caracterización y obtención de funciones para producción de biomasa en cinco cultivares de frijol yorimón: I. Método destructivo*. Técnica Pecuaria en México, vol. 43, núm. 3, septiembre-diciembre, 2005, pp. 449-458. Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias México. Disponible (en línea) <http://www.redalyc.org/pdf/613/61343315.pdf>
- BACA, B., SOTO, L., PARDO, M. 2000. Fijación biológica de nitrógeno. Disponible (en línea) <http://redalyc.uaemex.mx/redalyc/pdf/294/29403808.pdf>
- BRAUER, O. 2000. Fitogenética Aplicada. Editorial Limura. Bogotá – Colombia. p 428
- BRUNET, E.; LUIS, M.; *et al.* 1999. Comportamiento de cepas de *Rhizobium phaseoli* asociada al cultivo del frijol. I. Peso seco, número, % N y crecimiento de los nódulos. Centro Agrícola, Año 26, No. 4. Disponible (en línea) http://www.mag.go.cr/rev_meso/v06n01_068.pdf
- CASTILLO, F., ROLDÁN, M. *et al.* 2005. Biotecnología Ambiental. Editorial Zebor. 595 pag. Disponible (en línea) <http://books.google.com.ec/>
- CAYO, P.; ROJAS, F. 2004. Efecto de la inoculación de dos cepas de *Rhizobium* sp. En relación a la nodulación del cultivo de pallar (*Phaseolus lunatus* L.) abonado con humus de lombriz en la zona media del valle de Ica. Manejo Ecológico de suelos. Disponible (en línea) http://www.cepes.org.pe/pdf/OCR/Partidos/manejo_ecologico_de_suelos/manejo_ecologico_de_suelos-7.pdf
- CEVALLOS D. 2008. Evaluación de la adaptabilidad de 20 variedades y líneas de fréjol arbustivo (*Phaseolus vulgaris* L.) de grano rojo y amarillo en el valle de Intag, Imbabura. 2007. Santo Domingo, Ecuador. Escuela Politécnica del Ejército, Carrera de Ingeniería en Ciencias Agropecuarias. 1-9 p.
- CHAVARÍN E., I., *et al.* 2008. Fenología y acumulación de materia seca en variedades de fréjol arbustivo de diferente hábito de crecimiento. México. Avances de la Investigación Científica en el CUCBA. 25-30 p.

- CICEANA, A.C. 2007. Centro de Información y Comunicación Ambiental de Norte América. Disponible (en línea) <http://www.ciceana.org.mx/recursos/ciclo%20del%20nitrogeno.pdf>
- CONTRERAS S., C.; IRIARTE M., J., *et al.* 2007. Aislamiento y caracterización bioquímica, fisiológica y morfológica de géneros *Rhizobium* sp. y *Bradyrhizobium* sp., asociados a la leguminosa *Cajanus cajan* en parcelas agrícolas del Municipio de Sampués,
- DEBOUCK, D.; R. HIDALGO.; H. OSPINA y C. FLOR, 2004. Morfología de la Planta de fríjol Común, CIAT, Cali, Colombia, 49 p.
- DÍAZ-ALCÁNTARA C. 2010. Aislamiento, caracterización y selección de rhizobia autóctonos que nodulan habichuela roja (*Phaseolus vulgaris* L.), en la República Dominicana. Tesis Doctoral. Universidad de León. República Dominicana. 121. p. disponible en línea <https://buleria.unileon.es/bitstream/handle/10612/1585/Antonio.pdf?sequence=1>
- EXPÓSITO P., R.; GARCÍA B., N. 2011. Comportamiento productivo de cultivares de fréjol negro (*Phaseolus vulgaris*, L.) en la Cooperativa de Créditos y Servicios “José Manuel Rodríguez” del Municipio Jesús Menéndez. Cuba. 5 p.
- FAO (Food and Agricultural Organization). 2005. World crop and livestock statistics 1948-85.
- FERNÁNDEZ M. 1994. Avances en Ingeniería Genética. Madrid, España. CSIC-Dpto. de Publicaciones. 236 p.
- FERNÁNDEZ C., P. 2008. Efecto de la fertilización química y orgánica en cinco líneas promisorias de fréjol arbustivo (*Phaseolus vulgaris* L.) en la parroquia Rosario, Cantón Pelileo. Universidad Estatal de Bolívar. Facultad de Ciencias Agropecuarias Recursos Naturales y del Ambiente. Escuela de Ingeniería Agronómica. Guaranda, Ecuador. 5 p.
- FAO. 2006. FICHAS TÉCNICAS: Productos frescos y procesados. Disponible (en línea) http://www.fao.org/inpho_archive/content/documents/vlibrary/AE620s/index.htm
- GARCÍA, E. *et al.* 2009. Guía Técnica para el Cultivo de Frijol en los Municipios de Santa Lucía, Teustepe y San Lorenzo del Departamento de Boaco, Nicaragua. Disponible (en línea) http://www.redsicta.org/PDF_Files/guiaTecnicaFrijol_Boaco.pdf

- GONZÁLEZ, R.; NÚÑEZ, D.; *et al.* 2012. Efecto de la aplicación de *Rhizobium* y Mycorriza en el crecimiento del frijol (*Phaseolus vulgaris* L) variedad CC-25-9 negro. Artículos Generales. Centro Agrícola, 39(4): 17-20; octubre-diciembre. Disponible (en línea) http://cagricola.uclv.edu.cu/descargas/pdf/V39-Numero_4/cag044121877.pdf
- HERRERA, R. S.; GONZÁLEZ, S. B.; HARDY, C. Y PEDROSO, D. 1980. Análisis químico del pasto. Editorial Feliz Varela. La Habana, Cuba. 37 p.
- INIAP- PRONALEG-GA. 2007. Leguminosas de grano comestible. Disponible (en línea) http://www.iniap.gob.ec/nsite/images/stories/descargas/proyectos_inversion_iniap/priorizados_senplades/fortalecimiento_institucional/Matrices/Word/JUSTIFICACIONLEG-GA.doc
- INSTITUTO NACIONAL AUTÓNOMO DE INVESTIGACIONES AGROPECUARIAS MEXICANA (INIAP). 2011. *Manual de uso de Bioinoculantes en la agricultura* Disponible (en línea) <http://www.Downloads/BIOINOCULANTES.pdf>
- INSTITUTO NACIONAL DE ESTADÍSTICAS Y CENSOS (INEC). 2013 Disponible (en línea) <http://www.inec.gob.ec/estadisticas/>
- INSTITUTO NACIONAL DE ESTADÍSTICAS Y CENSOS (INEC). 2013. Disponible (en línea) <http://www.inec.gob.ec/estadisticas/>
- INEC-ESPAC. 2010. Visualizador de estadísticas agropecuarias del Ecuador. (En línea) Disponible en: [www.ecuadorencifras.com/lcds-samples\)testdrive-remoteobject/main.Html](http://www.ecuadorencifras.com/lcds-samples)testdrive-remoteobject/main.Html).
- LAFARGA A.; DELGADO J. 2007. Leguminosas. Navarra, España. ITG Agrícola. 28 p.
- MADIGAN M., *et al.* 2009. Biología de los microorganismos. Madrid, España. Pearson Educacion. 803-806 p.
- OCHOA y RUILOVA, 2014. Determinación de la eficiencia de bacterias diazotróficas en genotipos de fréjol común en la hoyo de Loja. Facultad de Ingeniería Agrónoma. Universidad Nacional de Loja. 68-71pp.

- ORTUBE, J. y C. AGUILERA, 2007. Recomendaciones Técnicas para el Cultivo de Fréjol en el Oriente Boliviano, CIAT-Universidad Autónoma “Gabriel Rene Moreno”, Santa Cruz, Bolivia, 60p.
- PAREDES, M. C. 2013. Fijación biológica de nitrógeno en leguminosas y gramíneas. Trabajo Final de Ingeniería en Producción Agropecuaria. Facultad de Ciencias Agrarias. Universidad Católica Argentina. Disponible (en línea) <http://bibliotecadigital.uca.edu.ar/repositorio/tesis/fijacion-biologica-nitrogeno-leguminosas.pdf>
- PÉREZ H., P.; ESQUIVEL E., G., *et al.* 2002. Caracterización física, culinaria y nutricional de fréjol del altiplano subhúmedo de México. Caracas, Venezuela. Archivos Latinoamericanos de Nutrición (ALAN) v.52 n.2. 172-180 p.
- PELCZAR, M., REID, R., CHAN, P. 1993. Microbiología. Cuarta edición. México: McGraw–Hill. p. 8-36.
- PRONALEG-GA (Programa Nacional de Leguminosas y Granos Andinos). 2005. Informe anual 2004: Actividades en fréjol (*Phaseolus vulgaris* L.). Quito, Ec.
- QUISHPE, G. 2012. Determinación de la influencia de fertilización foliar como complemento a la fertilización edafológica en la producción de fréjol arbustivo variedad INIAP-414 Yunguilla en el Cantón Paute. Capítulo II: *cultivo de fréjol arbustivo*. Disponible http://dspace.ups.edu.ec/bitstream/123456789/1085/3/Capitulo_II.pdf
- Qifu, M., N. Longnecker, N. Emery y C. Atkins. 1998. Growth and yield in *Lupinus angustifolius* are depressed by early transient nitrogen deficiency. Austr. J. Agric. Res. 49: 811-819.
- RIVAS M., J. 2004. Evaluación de 8 líneas avanzadas de Fréjol Común (*Phaseolus vulgaris* L.) en dos localidades de El Progreso, Guatemala. Universidad de San Carlos de Guatemala, Facultad de agronomía. Tesis Ing. Agr. Guatemala. 4-9 p.
- RODIÑO M., A. 2000. Caracterización morfoagronómica y bioquímica de germoplasma de judía común (*Phaseolus vulgaris* L.) de España. Universidad de Santiago de Compostela. Tesis de doctorado. Pontevedra, España. 2 p.

- RODRÍGUEZ, B.; LÓPEZ, M. 2009. Evaluación de la fertilización biológica del frijol con cepas nativas de *Rhizobium* aisladas de un ultisol de la altiplanicie del Estado Guarico. *Agronomía Trop.* 59(4): 381-386. Disponible (en línea)
http://sian.inia.gob.ve/repositorio/revistas_ci/Agronomia%20Tropical/at5904/pdf/5904rodriguez_b.pdf
- RODRÍGUEZ E.; LORENZO E., *et al.* 1997. Manual Técnico para el Manejo Integrado del Cultivo de Fréjol Común o Poroto. Panamá. IDIAP. 2-6 p.
- ROMERO R., G. 2009. Caracterización y evaluación de la efectividad de la fijación de nitrógeno de cepas de “*Rhizobium*”, asociadas a Pueraria (*Pueraria phaseoloides* (Roxb) Benth), como cultivo cobertura de la Palma Aceitera (*elaeis guineensis* Jacq). Escuela Politécnica del Ejército, Carrera de Ingeniería en Ciencias Agropecuarias. Santo Domingo, Ecuador. 15-26 p.
- RUIZ, R., y RINCÓN, 2006. El Cultivo de Fríjol, Temas de Orientación Agropecuaria No. 139, Bogotá, Colombia, pp: 13,17, 29-35,53-55.
- SIERRA, C.; LEÓN, E. *et al.* 2012. Evaluación de la sobrevivencia y eficiencia e invernadero y ensayos de campo de cepas aisladas localmente de rhizobia. Revista 24 de la Universidad del Valle de Guatemala. Disponible (en línea)
http://www.uvg.edu.gt/publicaciones/revista/volumenes/numero-24/7.EVALUACION_82-88c.pdf
- SILVA C., L. 2007. Estudio de la digestibilidad de carbohidratos y capacidad antioxidante de leguminosas de mayor consumo en México. Instituto Politécnico Nacional. Tesis de maestría. Yautepec. México. 8 p.
- SALAZAR, A.; ORDÓÑEZ, C. 2013. Aislamiento e Identificación de Actinomicetos Fijadores de Nitrógeno en suelo del Jardín Botánico de la Universidad Tecnológica de Pereira. Facultad de Tecnología Escuela de Tecnología Química Pereira. Consultado 10 jun 2014. Disponible (en línea)
<http://repositorio.utp.edu.co/dspace/bitstream/11059/3050/1/58073S161.pdf>
- SISTEMA DE INFORMACIÓN Y CENSO AGROPECUARIO (SICA). 2006.

- SUBÍA, C. 2001. Evaluación de tres cepas introducidas de *Rhizobium leguminosarum* en cuatro variedades de arveja *Pisum sativum* L. para la zona Interandina. Escuela Politécnica del Ejército. Facultad de Ciencias Agropecuarias. Disponible (en línea) <http://books.google.com.ec/>
- TORRES-GUTIÉRREZ R. 2008. Phytoestimulatory effect of *Rhizobium* and Plant Growth Promoting Rhizobacteria in common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) interaction. Dissertationes de Agricultura. PhD thesis, Katholieke Universiteit Leuven. 155 pp.
- TORRES-GUTIÉRREZ R., SUÁREZ N., PÉREZ C. 2004. Increments of biological nitrogen fixation by means of combined inoculation of atmospheric nitrogen fixation bacterias. 6th European Nitrogen Fixation Conference. Toulouse, France. Book of abstracts.
- URZÚA, H. 2005. Beneficios de la Fijación simbiótica en Chile. Departamento de Ciencias Vegetales. Facultad de Agronomía e Ingeniería Forestal. Pontificia Universidad Católica de Chile. Disponible (en línea) <http://agronomia.uc.cl/index.php?/Descargar-documento/606-Benefits-of-Symbiotic-Nitrogen-Fixation-in-Chile.html>
- VALDIVIA, R. 2011. ¿Cómo determinar el rendimiento de frijol en producción de semilla a nivel artesanal?. Asesor Técnico en Innovación, Experimentación y Producción. Proyecto A4N, Catholic Relief Services (CRS). Disponible (en línea) http://www.a4n.com.sv/uploaded/mod_documentos/METODOLOGIA%20PARA%20ESTIMAR%20RENDIMIENTOS%20EN%20FRIJOL.pdf
- VAN C., PASCAL B. 2005. Alteration of nitrogen cycling by agricultural activities, and its environmental and health consequences. *Gayana Bot.* [revista en la Internet]. 62(2): 98-109. Disponible en: http://www.scielo.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0717664320050002000005
- VEGA, J. y CHIRIBOGA, C. 2004. El fréjol su valor nutritivo y algunas formas de utilización. Ecuador. Instituto Nacional de Investigaciones Agropecuarias Boletín Divulgativo No235. 52 p
- Virgen, G., C. 2013. Bacterias promotoras del crecimiento vegetal. Cursos online INTAGRI.

9. ANEXOS

Anexo 1. Medios de cultivo para el aislamiento de microorganismos del suelo.

Bacterias: AGAR NUTRIENTE

- Agar nutriente 28 gr/1000 ml

Hongos: PDA (Papa-Dextrosa-Agar)

- Papa 200 gr
- Dextrosa 10 gr/1000 ml
- Agar 18 gr/1000 ml

Actinomicetos: AGAR CASEINA

- Peptona 5 gr/1000 ml
- Cloruro de sodio (NaCl) 5 gr/1000 ml
- Agar nutriente 23 gr/1000 ml
- Agar 4 gr/1000 ml
- Leche descremada 10 ml

Anexo 2. Preparación de soluciones para determinar el porcentaje de Materia Orgánica.

- Solución de Dicromato de Potasio 1 N

Para la elaboración de un litro de la solución dicromato de potasio 1 N se pesó 49.04 gr de dicromato de potasio ($K_2Cr_2O_7$), se conserva en un desecador y se afora a 1 000 ml con agua destilada.

- Difenilamina

Disolver 0.5 gr de difenilamina en 100 ml de ácido sulfúrico concentrado, esto se debe vertir en 20 ml de agua destilada, una vez obtenida la solución se recomienda conservar en frascos oscuros.

– Solución de Sal de Morh 0.5 N

Para la elaboración de la sal de Morh, se pesó 139.01 gr de sulfato de hierro II heptahidratado, agregar 500 ml de agua destilada y 15 ml de ácido sulfúrico concentrado, a esta mezcla aforar a 1000 ml con agua destilada. Para determinar la normalidad de la sal de Morh, se mide 5 ml de dicromato de potasio 1 N y se añade 100 ml de agua destilada, 5 ml de ácido fosfórico y 5 gotas de difenilamina. Se determinó el viraje de color de azul a verde para calcular el factor de corrección de la normalidad (INIAP, 2000).

– Fórmula para el cálculo de M.O.

$$MO (\%) = [(V_o - V) * N * 0.39 * 1.72 * 1.1] / PM$$

De donde:

V_o = Volumen gastado en la titulación del blanco (sin suelo).

V = Volumen gastado en la titulación de la muestra.

N = Normalidad exacta del sulfato de hierro.

0.39 = Peso químico equivalente del carbono.

1.72 = Constante de conversión de carbono a materia orgánica sobre la hipótesis de que la materia orgánica contiene 58 % de carbono en la generalidad de suelos encontrados en el Ecuador.

1.1 = Error de conversión de carbono a materia orgánica (10 %).

PM= Peso de la muestra de suelo.

Anexo 3. Preparación de soluciones para determinar Nitrógeno Amoniacal en Suelos.

– Preparación del fenol básico

En 500 ml de agua destilada disolver 100 gr de hidróxido de sodio (NaOH), dejar enfriar y seguidamente añadir 138 gr de fenol en cristales o 130 ml de fenol líquido al 92 %. Aforar a un volumen de 1 litro.

2. Solución patrón de nitrógeno

Pesar 9.69 gr de cloruro de amonio (NH₄Cl) y disolver en agua destilada hasta un volumen de 1 litro, dicha solución tiene una concentración de 2500 µg/ml. De la solución antes mencionada tomar 10 ml y llevar a un volumen de 1 litro con la solución extractante a fin de llegar a una concentración de 25 µg/ml.

Anexo 4. Preparación de soluciones para determinar fósforo en Suelos.

– Solución de reactivo concentrado

Disolver 0.250 gr de potasio y antimonio en 100 ml agua destilada; mientras se está mezclando añadir 41.25 ml de ácido sulfúrico (H₂SO₄) concentrado y dejar enfriar. En un frasco volumétrico disolver 1.875 gr de molibdato de amonio en aproximadamente 90 ml de agua destilada.

– Solución, reactivo de color para fósforo

Diluir 1 gr de goma de acacia y 1 gr de ácido ascórbico por litro, mezclar estas 2 soluciones añadir 150 ml de solución A y llevar a un volumen de 1 litro con agua destilada.

– Solución patrón de fósforo

Pesar 4.39 gr de fosfato de potasio (KH₂PO₄) y disolver en agua destilada hasta un volumen de 1 litro, esta solución contiene 1 000 µg/ml de P, de donde se toma una alícuota de 12 ml y llevar a un volumen de 1 litro con la misma solución extractante para obtener una concentración final de 12 µg/ml de P.

Anexo 5. Preparación de soluciones para determinar potasio, calcio y magnesio en Suelos.

- Oxido de lantano al 1 %

En 50 ml de agua destilada disolver 58.64 gr de óxido de lantano (La_2O_3) y agregar 100 ml de ácido clorhídrico (HCl) concentrado al 37 %, para posteriormente la mezcla aforarla a un volumen de 5 litros de agua destilada. Se recomienda que el ácido clorhídrico sea agregado cuidadosamente al óxido de lantano para evitar su reacción.

- Solución patrón: 5 000 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de K, 12 500 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de Ca, 5 000 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de Mg

Pesar 9.53 gr de KCl, 45.253 gr de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 41.793 gr de $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ y disolver por separado a un volumen de 1 litro (1 000ml) para obtener soluciones madres de las anteriores concentraciones. De dichas soluciones madres tomar 10 ml de potasio, 20 ml de la de calcio y 10 ml de magnesio, llevar a un litro con la solución extractante para obtener las concentraciones finales de: 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de potasio, 250 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de calcio y 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de magnesio.

Anexo 6. Parámetros de nodulación, biomasa de la raíz y follaje a los 30 DDS en frejol bola Variedad 60, con tratamientos y réplicas.

Trat	Replica	NN	PFN(g)	PFR(g)	PFF(g)	PSN(g)	PSR(g)	PSF(g)
1	1	9	0,0096	1,03	10,62	0,0035	0,25	2,63
1	2	3	0,0064	0,98	28,63	0	0,22	5,03
1	3	7	0,0089	1,07	18,47	0,0044	0,29	1,19
1	4	4	0,0076	0,69	3,34	0,0014	0,1	0,51
1	5	0	0	1,1	12,73	0	0,47	3,13
1	1	0	0	1,3	10,25	0	0,36	4,34
1	2	1	0,0011	1,37	30,71	0	0,56	8,15
1	3	0	0	1,36	19,61	0	0,35	5,9
1	4	6	0,1903	1,07	24,04	0,0182	0,37	9,32
1	5	0	0	1,15	8,68	0	0,25	1,37
1	1	2	0,0034	1,39	23,5	0,0001	0,34	8,97
1	2	6	0,0088	1,29	26,86	0,0028	0,39	7,81
1	3	5	0,0122	1,42	23,44	0,0057	0,53	6,66
1	4	8	0,056	1,44	30,99	0,0147	0,37	13,41
1	5	9	0,023	1,88	25,32	0,0073	0,4	11,4
1	1	6	0,0097	1,13	22,87	0,0019	0,27	10,7
1	2	7	0,0044	2,42	22,93	0,0009	0,31	8,61
1	3	10	0,0191	1,07	24,65	0,0072	0,3	10,4
1	4	6	0,0094	1,32	24,49	0,0022	0,31	9,61
1	5	8	0,0105	1,15	22,85	0,0076	0,29	8,66
2	1	0	0	1,66	15,58	0	0,49	3,08
2	2	0	0	0,9	12,28	0	0,22	4,98
2	3	0	0	1,47	22,71	0	0,51	10,18
2	4	10	0,399	1,3	36,9	0,0079	0,32	16,47
2	5	3	0,0115	1,08	24,58	0,0025	0,31	14,88
2	1	35	0,2564	1,27	16,22	0,0581	0,3	8,69
2	2	23	0,0786	1,52	28,12	0,0152	0,53	10,86
2	3	27	0,1118	1,23	28,28	0,023	0,35	16,13
2	4	14	0,0135	1,08	36,02	0,0094	0,27	22,42
2	5	5	0,0084	0,98	25,82	0,00022	0,2	11,7
2	1	9	0,00258	1,38	33,25	0,0089	0,32	5,54
2	2	7	0,0387	1,2	26,62	0,0055	0,35	10,58
2	3	5	0,0057	1,71	46,38	0	0,69	8,38
2	4	11	0,0085	1,8	50,4	0,0023	0,5	31,7
2	5	13	0,0954	1,28	41,19	0,0216	0,31	12,44
2	1	27	0,1336	1,96	24,8	0,0039	0,71	5,03
2	2	0	0	0,95	63	0,0055	0,28	10,88
2	3	1	0,026	2,71	58,08	0	0,91	9,7
2	4	17	0,087	1,76	25,33	0,0023	0,21	4,33
2	5	3	0,0094	1,34	23,51	0,0216	0,47	4,38

NN: Número de nódulos, PFN: Peso fresco de los nódulos, PSN: Peso seco nódulos PFR: Peso fresco de la raíz, PSR: Peso seco de raíz, PFF: Peso fresco del follaje, PSF: Peso Seco del follaje

Anexo 7. Componentes de rendimiento variedad bola 60 en condiciones de campo.

Trat	Replica	NVP	PVP(g)	NGV	NGP	PGP(g)
1	1	6	30,9	5,00	30	14,3
1	2	5	28,7	5,00	25	15,3
1	3	7	30,7	2,57	18	11,4
1	4	4	23,5	5,75	23	18,7
1	5	3	16,8	6,00	18	20
1	1	9	36,4	2,67	24	12,2
1	2	6	23,3	3,67	22	22,8
1	3	8	32,7	4,38	35	26,9
1	4	4	22,9	4,00	16	13
1	5	7	30,5	5,71	40	22,2
1	1	8	25,5	4,00	32	18
1	2	4	15,5	5,25	21	11,5
1	3	10	58	2,80	28	19,5
1	4	5	27,5	6,00	30	18,7
1	5	6	31	5,67	34	19,7
1	1	2	18,18	13,50	27	21,96
1	2	3	21,74	5,00	15	11,4
1	3	8	33,07	5,38	43	23,22
1	4	7	32,84	5,57	39	29,23
1	5	5	30,43	5,20	26	15,44
2	1	12	64,8	2,83	34	30
2	2	6	23,8	4,33	26	26,6
2	3	4	7,8	5,75	23	14,2
2	4	11	39,7	3,27	36	25,7
2	5	10	39,4	2,90	29	26
2	1	8	25,26	3,00	24	19,44
2	2	14	56,86	2,64	37	23,73
2	3	10	57,32	4,20	42	26,72
2	4	8	40,99	2,88	23	8,35
2	5	13	66,42	3,54	46	31,73
2	1	13	52,5	2,46	32	18,2
2	2	11	63,8	3,45	38	22,5
2	3	19	85,6	2,21	42	26,7
2	4	15	89,4	4,07	61	29,2
2	5	15	89,8	4,27	64	38,5
2	1	12	63,4	4,33	52	29,4
2	2	16	76,4	2,75	44	34,4
2	3	10	41,4	3,10	31	18,7
2	4	8	45,8	8,88	71	53,6
2	5	17	88	4,35	74	48,5

NVP: Numero de vainas por planta, PVP: Peso de vainas por planta, NGV: Numero de granos por vaina, NGP: Numero de granos por planta, PGP: peso de granos por planta

Anexo 8. Rendimiento agrícola de variedad bola 60 en condiciones de campo.

Trata	Replica	RDTO
1	1	781,6
1	2	883,7
1	3	620,6
1	4	655,6
2	1	1427,8
2	2	903
2	3	1124,7
2	4	974,1

Anexo 9. Análisis físico y químico del suelo con sus interpretaciones



**LABORATORIO DE ANÁLISIS FÍSICO-QUÍMICO DE SUELOS, AGUAS Y BROMATOLOGÍA
ÁREA AGROPECUARIA Y DE RECURSOS NATURALES RENOVABLES**

Provincia:	Loja	FECHA DE INGRESO:	04/05/2015
Cantón:	Catamayo	FECHA DE EGRESO:	29/06/2015
PROYECTO:	"Bioinoculante para fréjol"		

1. RESULTADO DE ANÁLISIS

Continuación del anexo 9.

Cód. Lab.	Cód. Cam.	Análisis Mecánico % TFSA			Textura	pH	M.O %	N ppm	P ₂ O ₅ ppm	K ₂ O ppm	Ca meq/100 ml	Mg meq/100 ml	Fe ppm	Mn ppm	Cu ppm	CE mmhos/cm
		Ao	Lo	Ac												
1614	Catamayo Inoc. 1 Antes de la siembra	36,6	23,8	39,6	FoAc	8.27	5,11	64,46	6,42	90,54	8,09	0,87	39,57	4,39	1,99	0.338
1618	Catamayo Testigo 2 control	40,8	23,6	35,6	Fo Ac	8.22	3,29	65,86	7,77	53,62	7,92	6,41	44,16	5,83	2,56	0.342
1621	Catamayo Bioinoculante	40,6	23,8	35,6	Fo Ac	8.07	5,73	59,31	24,79	62,34	7,87	0,30	40,97	2,93	2,56	0.962

2. INTERPRETACIÓN DE ANÁLISIS

Cód. Lab.	Cód. Cam.	Textura	pH	M.O	N	P ₂ O ₅	K ₂ O	Ca	Mg	Fe	Mn	Cu	CE
				%	ppm	ppm	ppm	meq/100 ml	meq/100 ml	ppm	ppm	ppm	mmhos/cm
1614	Catamayo Inoc. 1 Antes de la siembra	Franco Arcilloso	Medianamente Alcalino	Alto	Alto	Bajo	Bajo	Alto	Bajo	Medio	Bajo	Medio	No Salino
1618	Catamayo Testigo 2 control	Franco Arcilloso	Medianamente Alcalino	Medio	Alto	Bajo	Bajo	Medio	Alto	Alto	Medio	Medio	No Salino
1621	Catamayo Test 3 Bioinoculante	Franco Arcilloso	Alcalino	Alto	Medio	Medio	Bajo	Medio	Bajo	Alto	Bajo	Medio	No Salino

Anexo 10. Porcentaje (%) de nitrógeno fijado por cada tratamiento ya sea en semilla en fresco y seco

3914	MS	Semilla en fresco (Inoculado)		89,26%	100,00%	%N
	H			10,74%		
	N. Total					
	PC			16,74%	18,75%	3,00%
3915	MS	Semilla en seco (Inoculado)		89,04%	100,00%	
	H			10,96%		
	N. Total					
	PC			16,97%	19,05%	3,05%
3916	MS	Semilla en fresco (control)		88,59%	100,00%	
	H			11,41%		
	N. Total					
	PC			14,19%	16,02%	2,56%
3917	MS	Semilla en seco (control)		88,13%	100,00%	
	H			11,87%		
	N. Total					
	PC			16,03%	18,19%	2,91%

Anexo 11. Tríptico del día de campo

Resultados

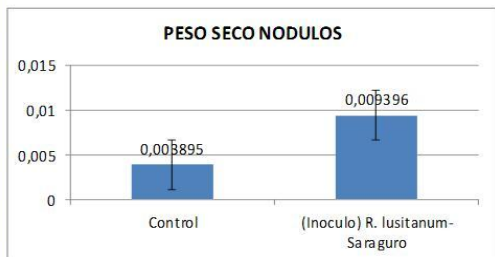


Figura 3. Peso (g) seco de nódulos totales, var. Bola

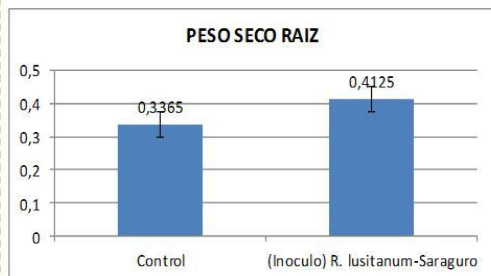


Figura 4. Peso (g) seco de raíz, var. Bola 60

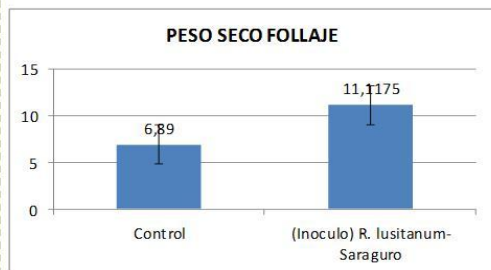


Figura 5. Peso (g) seco del follaje, var. Bola 60

Resultados

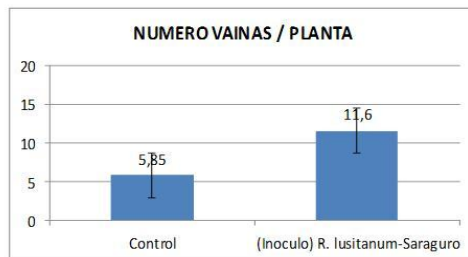


Figura 6. Número vainas por planta, var. Bola 60

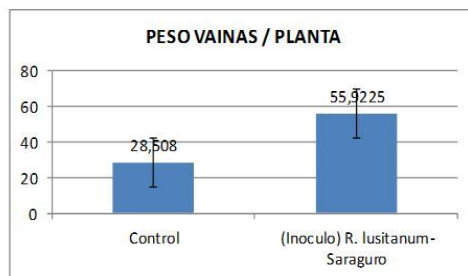


Figura 7. Peso de vainas por planta, var. Bola 60

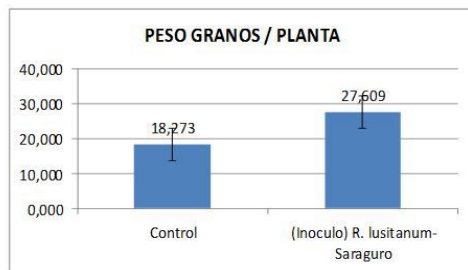


Figura 8. Peso (g) de vainas por planta, var. Bola 60



UNIVERSIDAD NACIONAL DE LOJA
 ÁREA AGROPECUARIA Y DE RECURSOS
 NATURALES RENOVABLES
 CARRERA DE INGENIERÍA AGRONÓMICA

DÍA DE CAMPO

TESIS:

“VALIDACIÓN DE UN BIOINOCULANTE A BASE DE BACTERIAS DIAZOTRÓFICAS EN EL CRECIMIENTO, DESARROLLO Y RENDIMIENTO AGRÍCOLA DE (*Phaseolus vulgaris* L.)”



TESISTA: Diana García

DIRECTOR: Ing. Klever Iván Granda Mora Mg. Sc.

Loja – Ecuador

2015

Introducción

La sustitución parcial o total de agroquímicos por microorganismos, manteniendo altos rendimientos de los cultivos, es una alternativa viable para lograr una producción sostenible y amigable con el ambiente, la utilización de microorganismos benéficos ha tenido una amplia difusión en los últimos años, debido a su efecto positivo sobre el rendimiento de muchos cultivos en distintas situaciones y a la factibilidad de permitir desarrollar una agricultura orgánica. Los inoculantes microbianos representan una nueva tecnología conducente a mejorar la productividad del sistema agropecuario a largo plazo. Puede ser considerada como una tecnología limpia, alineada con principios de la agricultura sustentable, frente al aumento desmedido de la utilización de pesticidas y fertilizantes en estos últimos tiempos. La incorporación de microorganismos seleccionados como Bioinoculantes por sus funciones en diversos procesos que contribuyan a la implantación, desarrollo y producción de cultivos es una alternativa que permite lograr aumentos en el crecimiento radical, y por ende el incremento de los cultivos como el caso del fréjol común.

Objetivos

Objetivo General

- Evaluar el efecto de un bioinoculante a base de bacterias diazotróficas simbióticas sobre parámetros morfológicos, biomasa y rendimiento en fréjol común variedad bola 60.

Objetivos específicos

- Evaluar el efecto del bioinoculante sobre parámetros de nodulación, biomasa, componentes de rendimiento, porcentaje de N total y rendimiento agrícola de la variedad bola 60 en condiciones de campo.
- Determinar la influencia de la aplicación del bioinoculante sobre las propiedades físicas, químicas y microbiológicas del suelo en el área de experimentación.
- Realizar un análisis de beneficio-costo de la aplicación del bioinoculante frente a la fertilización química.

Metodología

Metodología para el primer objetivo

Montaje del experimento con 4 replicas por tratamiento.

A los 7, 15 y 21 días después de la siembra (DDS), se analizaron los parámetros morfológicos.

A los 30 y 60 días (DDS), se evaluó los parámetros de nodulación y biomasa del cultivo de fréjol.

Al final de los 60 (DDS) se evaluó el contenido de N total de las semillas.



Metodología para el segundo objetivo

Se tomaron muestras a una profundidad de 20 cm en la rizosfera del suelo de cada una de las réplicas.

En el análisis físico del suelo, se evaluarán: Tipo y subtipo de suelo, textura, estructura, coeficiente de permeabilidad y porosidad. El análisis químico del suelo serán: pH, conductividad eléctrica (CE), % MO, N, P, K, Ca, Mg, Fe, Co, Mn.

El análisis microbiológico corresponderá al conteo de bacterias, hongos y actinomicetos (UFC gs-1)

Metodología para el tercer objetivo

Determinar el comportamiento económico de la utilización de inoculantes biológicos en fréjol en comparación con la fertilización química (CIMMYT, 1998), donde se tendrá en cuenta el presupuesto parcial, precios de campo, costos de campo y análisis marginal.

Resultados

TRAT.	8 DDS		15 DDS		21 DDS	
	Altura	NH	Altura	NH	Altura	NH
1	5,55 ^a	4,49 ^a	12,05 ^a	5,45 ^a	16,55 ^a	5,85 ^a
2	3,9 ^b	3,4 ^b	9,4 ^b	5,15 ^a	10,5 ^b	4,4 ^b
3	0,28*	0,19*	0,79*	0,19*	0,95*	0,30*

Tabla 1. Parámetros morfológicos, Tratamientos: 1 (Inoculado) 2 (Testigo) 3 (enor estándar), NH (numero de hojas)

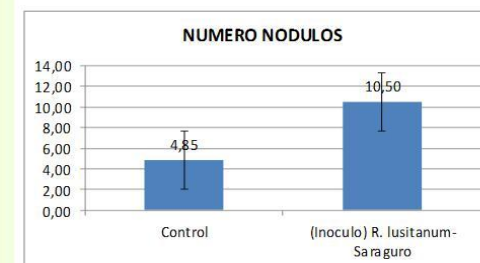


Figura 1. Número de nódulos totales, var. Bola 60

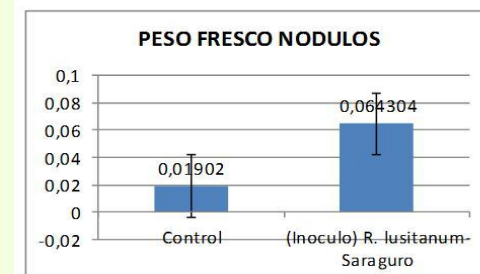




Figura 2. Peso (g) fresco de nódulos totales, var. Bola 60




Anexo 12. Evidencia fotográfica.


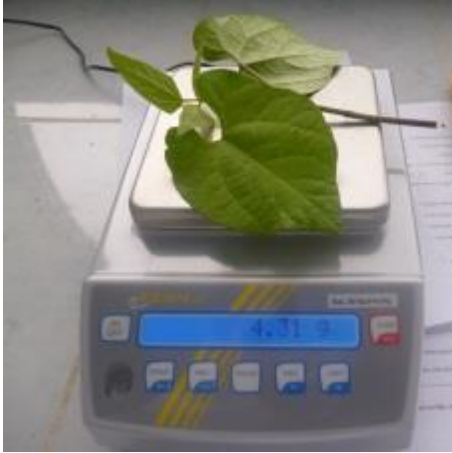

EVIDENCIA FOTOGRÁFICA DEL TRABAJO INVESTIGATIVO

Tema: “VALIDACIÓN DE UN BIOINOCULANTE A BASE DE BACTERIAS DIAZOTRÓFICAS EN EL CRECIMIENTO, DESARROLLO Y RENDIMIENTO AGRÍCOLA DE (*Phaseolus vulgaris* L.)”




Figura N°	Imagen	Descripción
ANÁLISIS DE PARÁMETROS DE NODULACIÓN		
1		Recolección de muestras, en el Cantón Catamayo Barrio San José
2		Lavado de las muestras recolectadas

Continuación anexo 12


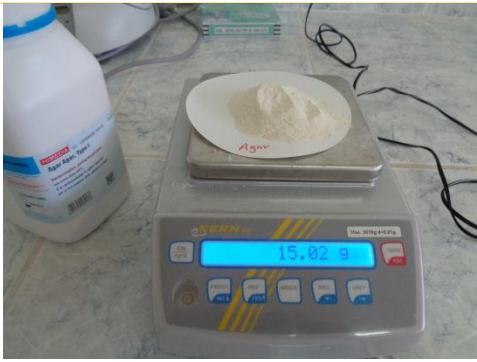


3		Secado de la raíz con los nódulos previo al conteo de los mismos
4		Conteo de Nódulos de las muestras recolectadas
EVALUACIÓN DE PARÁMETROS MORFOLÓGICOS		
5		Evaluación de la altura de las plantas de frejol bola 60.

6		Conteo del número de hojas de frejol de la variedad de bola 60.
PARAMETROS DE BIOMASA		
7		Peso del follaje de frejol de la variedad bola 60
8		Peso radicular de la variedad de frejol bola 60
PARAMETROS DE RENDIMIENTO		

Continuación anexo 12

9		Cosecha del cultivo de frejol bola para el análisis del rendimiento
10		Conteo de vainas y conteo de granos por vaina de frejol.
11		Peso de frejol bola 60.
ANALISIS MICROBIOLÓGICO DEL SUELO		

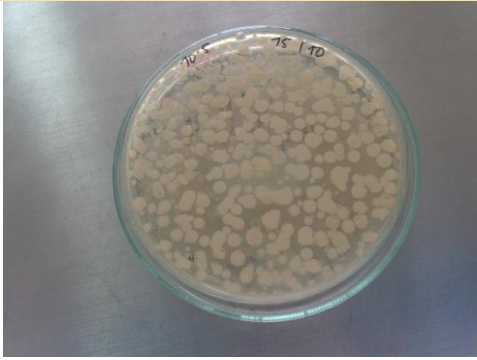
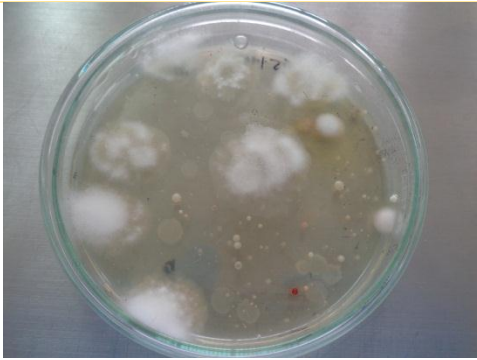
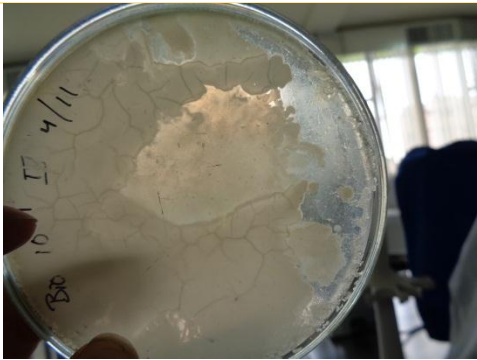

Continuación anexo 12

<p>12</p>		<p>Reactivos utilizados para los medios de cultivos.</p>
<p>13</p>		<p>Pesaje de agar nutriente, para la preparación del medio de cultivo.</p>
<p>14</p>		<p>Mezcla de los reactivos para la preparación del medio de Cultivo.</p>
<p>15</p>		<p>Autoclave para la esterilización del medio.</p>

Continuación anexo 12

<p>16</p>		<p>Pesaje de un gramo de suelo para realizar las diluciones.</p>
<p>17</p>		<p>Tubos de ensayo para realizar las diluciones.</p>
<p>18</p>		<p>Extracción de 1ml de dilución, colocada en la caja petri.</p>
<p>19</p>		<p>Incubación de cajas petri.</p>

Continuación anexo 12

<p>20</p>	 A petri dish containing a dense layer of small, circular, light-colored bacterial colonies on a solid agar medium. The colonies are uniform in size and color, covering most of the surface.	<p>Placa con colonias de bacterias</p>
<p>21</p>	 A petri dish showing a large, white, fuzzy fungal colony growing on a solid agar medium. The colony has a distinct, irregular shape and a soft, cottony texture.	<p>Placa con colonia de hongos</p>
<p>22</p>	 A petri dish showing a large, white, fuzzy colony of actinomycetes on a solid agar medium. The colony has a distinct, irregular shape and a soft, cottony texture. Handwritten text on the dish includes '10', '11', '12', and '13'.	<p>Placa de colonia con actinomycetos</p>
<p>23</p>	 A photograph of a classroom or lecture hall. Several students are seated at long tables, facing a front screen displaying a presentation. A lecturer is standing at the front of the room, presenting to the class.	<p>Exposición del día de campo en el módulo IV de la carrera de Ingeniería Agrónoma.</p>

