



UNIVERSIDAD NACIONAL DE INGENIERIA
Facultad de Tecnología de la Construcción

Monografía

**“EVALUACIÓN DE UN SUSTRATO ARTESANAL PARA LA PRODUCCIÓN DE
RHIZOBIUM EN EL CULTIVO DE FRIJOL, EN CENTRO NACIONAL DE
INVESTIGACIÓN AGROPECUARIA (INTA-CNIA)”.**

Para optar al título de Ingeniero Agrícola

Elaborado por

Br. Gabriela Fernanda Bravo Flores
Br. Digna Aurora Chavarría Rivera

Tutor

MSc. Ing. Emilseth Carolina Padilla Duarte

Asesor

Ing. Ana Yakarely Alaniz Medina

Managua, Octubre 2021

DEDICATORIA

El presente trabajo investigativo lo dedico principalmente a Dios, por haberme dado la existencia y las fuerzas para terminar este proceso de obtener uno de los anhelos más deseados, el cual en los momentos difíciles me ha dado la fortaleza para afrontarlos y salir adelante.

*A mi madre **Marina Concepción Flores López**, por su amor, sacrificio y apoyo incondicional todos estos años sin el cual no hubiera podido alcanzar esta meta, por sus constantes oraciones para que lograra terminar y mantenerme libre de todo peligro.*

*A mi abuelita **Petronila López** que al igual que mi mamá me tuvo en oraciones siempre que salía de casa, por sus consejos y apoyo.*

A todas las personas que me han apoyado y han hecho que este trabajo se realice con éxito, en especial a aquellos que nos abrieron las puertas y compartieron sus conocimientos.

Br. Gabriela Fernanda Bravo Flores.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a Dios por bendecirme con la vida, por guiarme a lo largo de este camino, ser el apoyo y la fortaleza en aquellos momentos de dificultad y debilidad.

Gracias a mi mamá y mi abuelita por confiar y creer en mis expectativas, a ellas que siempre estuvieron apoyándome y aconsejándome para lograr este sueño.

A nuestra tutora **MSc. Ing. Emilseth Carolina Padilla Duarte**, a nuestra asesora **Ing. Ana Yakarely Alaniz Medina**, que más que asesora es una amiga, por todo su tiempo, dedicación y acompañamiento en todo el proceso de investigación transmitiéndonos sus conocimientos para la elaboración de nuestra monografía.

A los **Ing. Ericka Cabeza, Roberto Cañas, Victorino Blandón**, por ser parte de esta investigación y aportar un granito de conocimiento a lo largo de este camino ayudándonos a superar las dificultades.

A la Universidad Nacional de Ingeniería (UNI) por habernos acogido y formado como profesionales convirtiéndose en nuestra alma mater.

Al Instituto Nicaragüense de Tecnología agropecuaria (INTA), por el apoyo que nos brindó con las instalaciones del laboratorio de Biotecnología para la realización de nuestro estudio.

A todas las personas que apoyaron e hicieron posible que lográramos terminar la investigación con éxito.

Br. Gabriela Fernanda Bravo Flores.

DEDICATORIA

La presente tesis está dedicada a **DIOS** quien me dio la existencia, los medios y las fuerzas para poder concluir con este logro.

A mi hijo **MOISÉS ENMANUEL CHAVARRÍA** quien llegó a mi vida desde el comienzo de mi carrera y recorrió a mi lado los pasillos de la universidad. Hoy quizás no comprenda a plenitud estas palabras, pero cuando sea capaz quiero que sepa que fue un pilar fundamental durante este proceso. Cada beso, cada abrazo, cada muestra de amor incondicional, fueron suficientes para no rendirme y llegar a la meta final.

A mis padres **MARTHA ELENA RIVERA** y **MIGUEL ROBERTO CHAVARRÍA** **quienes** me forjaron como persona gracias a ellos soy la persona que soy hoy día.

A mi hermana **MIURIS CHAVARRIA RIVERA** quien siempre estuvo a mi lado incondicionalmente, dando ánimos y confiando plenamente en mis capacidades

A todas las personas que creyeron en mí y estuvieron a mi lado.

Br. Digna Aurora Chavarría Rivera

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a **DIOS** por darme la vida y ser mi guía a lo largo del camino, por ser mi refugio y mi fortaleza en aquellos momentos en los que sentía que no podía más.

Gracias a mi **FAMILIA** que siempre me brindaron palabras de aliento y apoyo incondicional en las decisiones que tomé a lo largo de mi formación académica y personal.

A nuestra tutora **MSc. Ing. EMILSETH CAROLINA PADILLA DUARTE** por su tiempo, dedicación para transmitirnos su conocimiento para la elaboración de esta tesis.

Al **Ing. DONAL JUÁREZ** por brindarnos sus conocimientos y apoyarnos en la corrección detallada de la tesis, además de agradecerle su tiempo, voluntad y dedicación para lograr culminar con este tema de Investigación.

A los **Ing. ERICKA CABEZA, ROBERTO CAÑAS, VICTORINO BLANDÓN**, quienes también nos aportaron grandemente de sus conocimientos en esta investigación.

A la **UNIVERSIDAD NACIONAL DE INGENIERÍA (UNI)** por habernos acogido y formado como profesionales convirtiéndose en nuestra alma mater y al **INSTITUTO NICARAGÜENSE DE TECNOLOGÍA AGROPECUARIA (INTA)**, por el apoyo que nos brindó con las instalaciones del laboratorio de Biotecnología para la realización de nuestro estudio.

A todas las personas que apoyaron e hicieron posible que lográramos terminar la investigación con éxito.

Br. Digna Aurora Chavarría Rivera

Resumen

Esta investigación se realizó en el laboratorio de biotecnología del Centro Nacional de Investigación Agropecuaria (CNIA), ubicado en la ciudad de Managua con el objetivo de evaluar un sustrato artesanal para la producción de *Rhizobium* en el cultivo de frijol (*Phaseolus vulgaris*) variedad INTA fuerte sequía.

Al mismo tiempo se evaluó el mejor medio de cultivo líquido para el desarrollo de la bacteria con relación a su multiplicación por día. La multiplicación en sustratos sólidos se determinó por semanas hasta la etapa de floración para obtener la cantidad de nódulos en cada sustrato y definir una alternativa de producción de *Rhizobium*.

Los factores evaluados fueron dos medios de cultivos líquidos artesanales API Y FRIJOL y cuatro sustratos sólidos. Se utilizaron como testigo el medio de cultivo líquido YMA y para los sustratos sólidos TURBA en la evaluación de semanas.

El diseño experimental utilizado fue DCA sin repeticiones con un enfoque mixto. Los datos se procesaron utilizando un análisis de varianza (ANDEVA) y se utilizó las separaciones de medias por el método de TUKEY ($P \leq 0.05$).

Teniendo diferencias significativas para los medios de cultivos líquidos siendo el medio Frijol con la cepa CIAT 899 el que se multiplicó en menor tiempo y los sustratos sólidos Lombrihumus y suelo con la cepa CR 477 y CIAT 899 la mejor multiplicación con respecto al paso de las semanas, pero teniendo una mayor producción de nódulos en la etapa de floración con el medio líquido API y la cepa CR 477 y obteniendo un biorreactor con medio de cultivo frijol con la cepa CIAT 899 como alternativa de producción más artesanal.

INDICE

I. INTRODUCCIÓN.....	3
II. ANTECEDENTES	4
III. JUSTIFICACIÓN	5
IV. OBJETIVO.....	6
4.1 Objetivo General.....	6
4.2 Objetivos Específicos	6
V. MARCO TEÓRICO	7
5.1 Importancia socioeconómica del cultivo del frijol (<i>Phaseolus vulgaris</i>)	7
5.2 Importancia de consumir frijol y sus nutrientes	8
5.3 Leguminosas	8
5.3.1 Fases del desarrollo de la planta	9
5.3.2 Crecimiento.....	9
5.4 Variedad.....	11
5.4.1 INTA Fuerte Sequía	11
5.5 Simbiosis <i>Rhizobium</i> – leguminosas.....	11
5.6 Fijación de Nitrógeno	12
5.7 Los Rizobios.....	12
5.7.1 Proceso de Nodulación	13
5.7.2 Inoculantes.....	13
5.7.3 Producción de Inoculantes.....	14
5.8 Medios de Cultivos Artesanales.....	15
5.9 Sustratos	15
5.9.1 Características de los Sustratos	15
5.9.2 Estabilidad física	15
5.9.3 Aireación.....	16
5.9.4 Capacidad de retención de agua.....	16
5.10 Tipos de Sustratos.....	16
5.11 Método de multiplicación (Biorreactor).....	17
5.12 Programas estadísticos.....	17
5.12.1 Análisis de varianza (ANDEVA)	17
5.12.2 Diseño Factorial sin replica.....	18
5.12.3 Prueba de Tukey.....	18

5.12.4	Software JMP.....	19
5.12.5	Software Rbio.....	19
5.12.6	Software Genes.....	20
VI.	HIPÓTESIS	21
6.1	Hipótesis de Investigación (Hi):.....	21
6.2	Hipótesis Nula (H0):	21
6.3	Hipótesis Alternativa (Ha):	21
VII.	DISEÑO METODOLÓGICO	22
7.1	Tipo de Investigación	22
7.1.1	Según el enfoque de la investigación.....	22
7.1.2	Según el alcance de los resultados.....	22
7.1.3	Según el tiempo de ocurrencia.....	22
7.1.4	Según el período en que se realiza el estudio.....	22
7.2	Descripción de la Zona	23
7.2.1	Localización.....	23
7.2.2	Condiciones Climáticas.....	24
7.3	Etapas en las que se dividió el estudio.....	24
7.4	Metodología para la determinación del crecimiento de dos cepas de <i>Rhizobium</i> en medios de cultivos líquidos bajo condiciones controladas.....	25
7.5	Metodología para la estimación de la eficiencia de los medios sólidos combinados con medios líquidos.....	26
7.6	Metodología para definir una Técnica de reproducción de <i>Rhizobium</i>	28
7.7	Operacionalización de variables	29
VIII.	ANÁLISIS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS	31
8.1	Evaluación de medios de cultivo líquidos por día	31
8.2	Evaluación de la sobrevivencia en sustratos artesanales sólidos bajo condiciones controladas de humedad y temperatura y en condiciones ambientales por un período de cuatro semanas	33
8.3.	Evaluación de variables de plantas	38
8.3	Evaluación del biorreactor.....	46
IX.	CONCLUSIONES.....	52
X.	RECOMENDACIONES	53
XI.	BIBLIOGRAFIA.....	54
XII.	ANEXOS.....	i

INDICE DE TABLAS

Tabla 1. Valor nutricional de 100 g de frijol.....	8
Tabla 2. Combinación de medios de cultivos líquidos y sustratos solidos con cepas	27
Tabla 3. Análisis de varianza y separación de medias para el factor día de la multiplicación de dos cepas de Rhizobium respecto a diferentes el factor día de la variable conteo de individuos.	32
Tabla 4. Análisis de varianza para las variables de conteo de individuos y unidades formadoras de colonias.	34
Tabla 5. Análisis de varianza para la variable largo de raíz de la planta.	41
Tabla 6. Análisis de varianza para la variable total de nódulos de la planta.	43
Tabla 7. Escala de nodulación.	45
Tabla 8. Análisis de varianza para la variable oxígeno disuelto.	46
Tabla 9. Análisis de varianza para la variable conteo de colonias.....	49
Tabla 10. Análisis de varianza para la variable unidades formadoras de colonias en los medios de cultivo líquidos por día.	i
Tabla 11. Análisis de varianza para la variable diámetro de la planta.	i
Tabla 12. Análisis de varianza para la variable altura de la planta.	i
Tabla 13. Análisis de varianza para la variable peso fresco de la planta.	ii
Tabla 14. Análisis de varianza para la variable peso seco de la planta.....	ii
Tabla 15. Análisis de varianza para la variable peso seco de raíz de la planta.	ii

INDICE DE GRÁFICOS

Gráfico 1. Número de individuos y Unidades Formadoras de Colonias del medio liquido FRIJOL y medios solidos artesanales distribuidos en cuatro semanas de la cepa CR 477.	35
Gráfico 2. Número de individuos y Unidades Formadoras de Colonias del medio API frente a semana de la cepa CR 477.....	36
Gráfico 3. Número de individuos y Unidades Formadoras de Colonias del medio API frente a semana de la cepa CIAT 899.	37
Gráfico 4. Número de individuos y Unidades Formadoras de Colonias del medio FRIJOL frente a semana de la cepa CIAT 899.	38
Gráfico 5. Test de tukey para la variable diámetro de la planta en los medios de API y FRIJOL.....	39
Gráfico 6. Test de tukey para la variable altura de la planta en los medios de API y FRIJOL.....	40
Gráfico 7. Test de tukey para la variable longitud de raíz de la planta en los medios API y FRIJOL.....	41
Gráfico 8. Longitud de raíz del medio api y frijol frente a sustratos de las cepas CR 477 y CIAT 899.....	42
Gráfico 9. Test de tukey para la variable total de nódulos de la planta en las cepas CR 477 y CIAT 899.....	44
Gráfico 10. Oxígeno disuelto de los medio API, FRIJOL y YMA de la cepa CR 477 para agitador y biorreactor.....	47

Gráfico 11. Oxígeno disuelto de los medio API, FRIJOL y YMA de la cepa CIAT 899 para agitador y biorreactor.....	48
Gráfico 12. Unidades formadoras de colonias de los medios API, Frijol y YMA de las cepa CR477 y CIAT899 para agitador y biorreactor.....	50
Gráfico 13. Número de Individuos y Unidades Formadoras de Colonias del Medio YMA y API frente a día de la cepa CR 477.....	iii
Gráfico 14. <i>Número de Individuos y Unidades Formadoras de Colonias del Medio API, FRIJOL y YMA, frente a día de la cepa CIAT 899.</i>	iv
Gráfico 15. Número de Individuos y Unidades Formadoras de Colonias de los días 2 y 4, frente a las Cepas CR 477 y CIAT 899, del medio YMA. y “FRIJOL”	v
Gráfico 16. Test de Tukey para la variable conteo de individuo en las cepas CR 477 y CIAT 899.....	vi
Gráfico 17. Test de Tukey para la variable Unidades Formadoras de Colonias cepas CR 477 y CIAT 899.....	vi
Gráfico 18. Test de Tukey para la variable peso fresco de la planta en las cepas CR 477 y CIAT 899.....	vii
Gráfico 19. Test de Tukey para la variable peso fresco de la planta en los medios API y FRIJOL.....	vii
Gráfico 20. Test de Tukey para la variable peso seco de la planta en los medios API y FRIJOL.....	vii
Gráfico 21. Test de Tukey para la variable peso seco de raíz de la planta para las cepas CIAT 899 y CR 477.....	viii
Gráfico 22. Test de Tukey para la variable peso seco de raíz de la planta en los medios API y FRIJOL.....	viii

INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Tipo de crecimiento del tallo de Frijol.....	9
Figura 2. Etapas de reproducción del frijol.....	10
Figura 3. Macro Localización.....	23
Figura 4. Micro Localización.....	24
Figura 5. Selección del grano de frijol para medio artesanal de FRIJOL.....	ix
Figura 6. Selección de material vegetal para medio de cultivo artesanal API.....	ix
Figura 7. Medios de cultivos líquidos artesanales, API (color amarillo) FRIJOL (color rojizo).....	ix
Figura 8. Prueba de gota en plato Petri con rojo Congo dentro de cámara de flujo.....	ix
Figura 9. Bacteria Rhizobium en plato Petri con rojo Congo segmentado en partes iguales.....	ix
Figura 10. Tubos de ensayos con soluciones de medios de cultivos líquido artesanales listo para prueba de gota.....	ix
Figura 11. Nódulos de Rhizobium en raíz de la planta de frijol.....	ix
Figura 12. Medición del diámetro de tallo de la planta con vernier.....	ix
Figura 13. Extracción de raíces de macetera.....	ix
Figura 14. Peso de parte aérea de la planta.....	ix
Figura 15. Nódulos de rhizobium ya extraído de raíz.....	ix

I. INTRODUCCIÓN

Las leguminosas constituyen la principal fuente de proteínas en muchos países en desarrollo, en especial entre los grupos de población más pobres, que obtienen las proteínas y la energía de fuentes vegetales. Mientras en países desarrollados, donde el consumo de legumbres ha disminuido con los años, la consideración de alimentos saludables ha favorecido el incremento de su consumo (Musquiz, 2005).

El frijol es un rubro de suma importancia para la dieta de los nicaragüenses, el contenido nutricional proporciona un alimento bajo en grasas y de aporte benéfico para los que lo consumen (Arias et al, 2007) En el ciclo de producción nacional 2017/2018 los rendimientos promedios fueron de 13.3 qq/mz, con exportaciones de 1, 600, 000 qq que generaron ingresos de 73,080,000 millones de dólares al país (BCN, 2019).

Sin embargo, La aplicación de fertilizantes químicos afecta negativamente a la fertilidad de suelos en todo el mundo; Asimismo, los pequeños productores no tienen acceso a la adquisición de estos productos. Para resolver esta problemática, se han integrado prácticas agrícolas que promueven la utilización de inoculantes biológicos y lograr un manejo sustentable en la agricultura. (Bharti et al., 2015

Las bacterias como los rizobios son una alternativa biológica ya que pueden realizar simbiosis con las raíces de plantas leguminosas, formar nódulos radicales y realizar la fijación biológica de nitrógeno. La importancia de estas bacterias es que suministran un 50 % de nitrógeno al cultivo. Por lo cual es posible reducir el uso de fertilizantes químicos (Madigan et al. 2000).

Este estudio tuvo la finalidad de poder brindarle al productor una alternativa de producción de *Rhizobium* de manera artesanal completa no solo con medios líquidos sino utilizando un biorreactor de manera que pueda mejorar la calidad y eficiencia de su producto.

II. ANTECEDENTES

(Urbina & Cáseres, 2004). En este experimento se utilizó un diseño de BCA (bloques completos al azar) con cuatro repeticiones y siete tratamientos, en donde se evaluaron los cultivos (maíz y frijol) así como también los socios de plantas de maíz y frijol inoculado con cepas nativas de *Rhizobium* y no inoculado bajo los arreglos de siembra. Los resultados obtenidos indican que los socios tuvieron un comportamiento variable en cuanto a la abundancia y biomasa de maleza. Los mayores rendimientos de grano se obtuvieron en el monocultivo por tener una mayor cantidad de plantas por unidad de área, por su parte en el maíz presentó el mayor rendimiento en lo que respecta al uso equivalente de la tierra (UET). Los socios M1:F1-C, M1: F-C, M2:F2-S y M2:F2-C resultaron ser más eficientes que los monocultivos los socios presentaron 92%, 71%, 87% y 49% más de producción por área que los monocultivos. Los socios M1:F1-S y M2:F2-S resultaron ser la alternativa más económica para el productor.

(Recinos & García, 2007) colectaron nódulos radiculares “activos” provenientes de plantas de frijol cultivadas en tres localidades del Municipio de Santo Tomás, del departamento de San Salvador. Estos nódulos fueron esterilizados y macerados a fin de obtener suspensiones de los rizobios simbiotes para ser inoculados en tres variedades de frijol: Frijol Rojo de Seda, CENTA Pipil y CENTA San Andrés. Para ello se utilizaron Jarras de Leonard. Obteniendo como resultados que los rizobios provenientes de las tres localidades presentaron compatibilidad con las tres variedades utilizadas.

Según (FAO, 2011) La Unión de Productores Agropecuarios de Nicaragua (UPANIC) ha desarrollado un biofertilizante bajo el nombre NITRONAT el cual está elaborado, con bacterias del género *Rhizobium phaseoli*; las cuales propician la creación de nódulos en las raíces del cultivo de frijol para que la planta pueda fijar y asimilar el nitrógeno del aire. Con el objetivo de reducir la dosis de fertilizantes nitrogenados, mejorar los rendimientos y trabajar en armonía con el medio ambiente.

III. JUSTIFICACIÓN

Rhizobium es una bacteria fijadora de nitrógeno atmosférico el cual sirve mediante la relación simbiótica con cepas de *Rhizobium*. Esta evaluación servirá a los pequeños productores con suelo que presenten deficiencia de nitrógeno.

Evitar el uso indiscriminado de fertilizantes nitrogenado beneficia a la agricultura ya que siempre han provocado un grave problema de contaminación.

El pequeño productor no tiene alcance de obtener *Rhizobium* por medio de turba ya que estas tienen un alto costo, por esta razón es que se crea la necesidad de evaluar sustratos artesanales para lograr sustituir la materia prima en la cual crece de forma viable.

La evaluación es viable ya que los sustratos estudiados son de carácter artesanal lo que implica el uso de materiales que se encuentran al alcance del pequeño productor, se asegura un alto rendimiento y disminuye el uso de fertilizantes edáficos disminuyendo costos y presentando alternativas locales para obtener acceso a la materia prima.

Con esta investigación se dará respuesta a la siguiente interrogante ¿Cuáles son los factores que inciden en la calidad productiva en el cultivo del frijol al aplicar *Rhizobium* por medio de un sustrato artesanal?

Con el uso de esta bacteria como fijadora de nitrógeno se disminuye trascendentalmente la aplicación de fertilizantes químicos, al utilizar el nitrógeno atmosférico evita que el suelo tenga déficit del mismo creando un nitrógeno combinado.

IV. OBJETIVO

4.1 Objetivo General

- Evaluar un sustrato artesanal para la producción de *Rhizobium* en el cultivo de frijol en el Centro Nacional de Investigación Agropecuaria (INTA-CNIA).

4.2 Objetivos Específicos

- Determinar el crecimiento de dos cepas de *Rhizobium* en medios de cultivos líquidos bajo condiciones controladas.
- Estimar la eficiencia de los medios sólidos combinados con medios líquidos aplicándolos en el cultivo de frijol llevado hasta la etapa de floración.
- Definir una técnica adecuada para reproducción de *Rhizobium* como alternativa al pequeño productor.

V. MARCO TEÓRICO

5.1 Importancia socioeconómica del cultivo del frijol (*Phaseolus vulgaris*)

El acelerado crecimiento de la población mundial en las últimas cinco décadas, está demandando que la producción de alimentos se incremente de manera importante y sostenible.

Este incremento de producción de alimentos, deberá realizarse con las mismas áreas de siembra disponibles actualmente, ya que con el paso del tiempo hay menos áreas arables para la agricultura, pasando de 0.45 en el año 1950 a 0.20 hectáreas por persona en el 2020. Esto significa que el crecimiento en la producción de alimentos debe ser con el aumento de la productividad de cada uno de los cultivos de forma sostenible (FAO, 2020).

Un factor importante para aumentar la productividad de los cultivos, es la implementación de alternativas amigables con el medio ambiente el uso de fertilizantes biológicos que contribuyen a una producción sostenible de alimentos.

En Nicaragua el rubro frijol se ha cultivado históricamente en función de la dieta alimenticia del nicaragüense, constituida por maíz, frijol y arroz, por tanto, es la principal fuente de proteínas.

Según (FAO, 2020) realizó un análisis de la situación actual de la agricultura en Nicaragua, indicando que este sector ha mostrado un crecimiento, en términos de áreas sembrada, del 76% en los últimos 10 años, registrándose en 2019 la siembra de 1.5 millones de manzanas. De las áreas sembradas alrededor de un 53% son áreas de frijol y maíz, cuyos índices de productividad todavía siguen siendo bajos en comparación con los países de la región centroamericana.

5.2 Importancia de consumir frijol y sus nutrientes

Según (Arias et al, 2007) El frijol contiene 12.3% de proteínas 7% de hierro y 2.2% de vitamina B características que la convierten en la leguminosa más cultivada del mundo. Además, contiene una importante cantidad de calcio y ácido fólico, que son esenciales para una buena salud, especialmente para las mujeres que están embarazadas.

Esto es de suma importancia, tomando en cuenta los beneficios de la fibra para reducir los niveles de colesterol en la sangre y el riesgo de enfermedades crónicas, como, por ejemplo: obesidad, diabetes y cáncer.

Tabla 1. Valor nutricional de 100 g de frijol

COMPONENTE	VALOR
Energía	322Kcal
Proteína	21,8 g
Grasas	2,5 g
Carbohidratos	55,4 g
Tiamina	0,63 mg
Niacina	1,8 mg
Calcio	183 mg
Hierro	4,7 mg

Fuente: obesidad.net/spanish 2002 default.

5.3 Leguminosas

Las leguminosas constituyen la principal fuente de proteínas en muchos países en desarrollo, en especial entre los grupos de población más pobres, que obtienen las proteínas y la energía de fuentes vegetales. Mientras en países desarrollados, donde el consumo de legumbres ha disminuido con los años, la consideración de alimentos saludables ha favorecido el incremento de su consumo (Musquiz, 2005).

Otros aspectos de interés de las leguminosas es la adaptación a suelos y climas poco favorables y su papel en la rotación de cosechas por su capacidad para fijar nitrógeno al suelo, gracias a la simbiosis con diversas bacterias radiculares (FAO, 2005).

5.3.1 Fases del desarrollo de la planta

El desarrollo de la planta de frijol comprende dos fases que son: vegetativa y reproductiva.

La vegetativa se inicia en el momento en que la planta dispone de condiciones favorables y termina cuando aparecen los primeros botones florales. En esta fase la planta forma toda la estructura vegetativa que ella necesita para comenzar su reproducción.

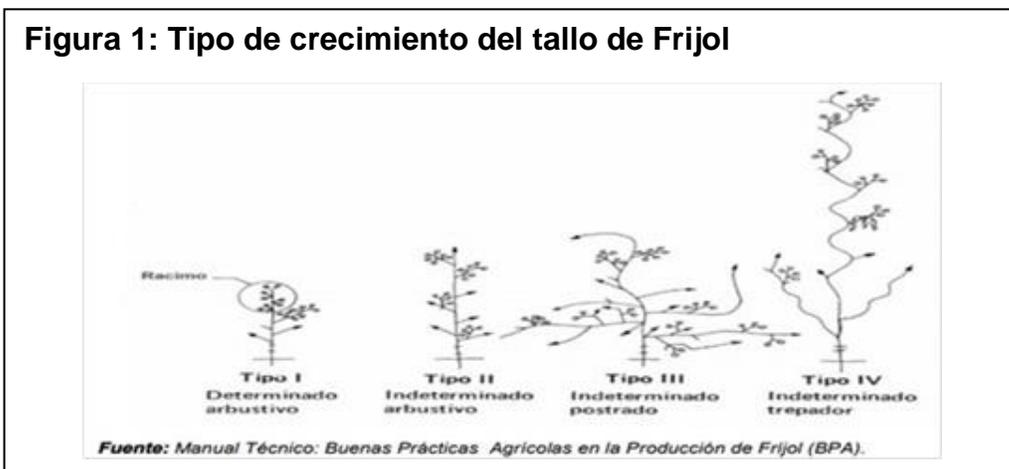
La reproductiva termina cuando el grano alcanza la madurez necesaria para la recolecta (Alvarez, 2018).

5.3.2 Crecimiento

Según (Rodriguez et al. 1997) El hábito de crecimiento se define como la expresión fenotípica de la planta de frijol que manifiesta el desarrollo de caracteres morfológicos distintos entre los diversos tipos de crecimiento (vegetativo o floral) de la rama y tallo de las plantas, que no son influenciados por el medio ambiente.

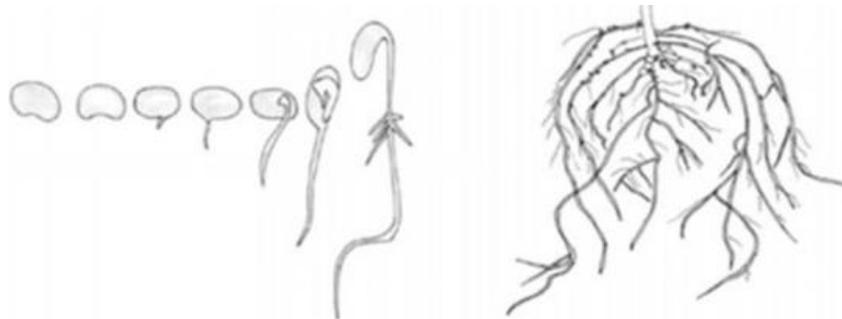
Los principales caracteres que determinan el hábito de crecimiento son:

- Tipo de desarrollo de la parte terminal del tallo:
- Determinado
- Indeterminado



- Número de nudos.
- Longitud de los entrenudos y altura de la planta.
- Distribución y longitud de los entrenudos a lo largo del tallo, lo cual determina la amplitud para trepar y el tipo de ramificación.
- Raíz: En la primera etapa de desarrollo, el sistema radical está formado por la radícula del embrión la cual se convierte posteriormente en la raíz principal o primaria. A los pocos días de la emergencia de la radícula es posible ver las raíces secundarias que se desarrollan especialmente en la parte superior o cuello de la raíz principal.
 - ✓ Sobre las raíces secundarias se desarrollan las raíces terciarias y otras subdivisiones como los pelos absorbentes, los cuales, además, se encuentran en todos los puntos de crecimiento de la raíz. La raíz principal se puede distinguir entonces por su diámetro y mayor longitud, en general el sistema radical es superficial, ya que el mayor volumen de raíces se encuentra en los primeros 20 centímetros de profundidad del suelo (Arias et al. 2007).

Figura 2: Etapas de reproducción del frijol.



Fuente. Manual Técnico: Buenas Prácticas Agrícolas en la Producción de Frijol (BPA).

5.4 Variedad

5.4.1 INTA Fuerte Sequía

Características relevantes

Esta variedad tiene su origen en el Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT), es de tipo arbustivo con un hábito de crecimiento indeterminado presentado guías medianas, con días de floración que van de 33 – 34 días, la maduración fisiológica entre 63 – 65 días, la cosecha se presenta de 72 – 75 días, el grano tiene un color rojo oscuro brillante.

Resistente a mosaico común y dorado, tolerante a altas temperaturas, tiene de 4 – 6 granos por vaina, presentando entre 13 – 18 vainas por planta, para un potencial de rendimiento de 20 – 25 qq/mz (INTA, 2014).

5.5 Simbiosis *Rhizobium* – leguminosas

El nitrógeno es muy abundante en la atmósfera, sin embargo, las plantas no pueden utilizarlo en su forma elemental y tienen que obtenerlo del suelo principalmente en forma de nitratos o amonio. La fijación biológica de nitrógeno es un proceso clave en la biosfera, por el cual microorganismos portadores de la enzima nitrogenada convierten el nitrógeno gaseoso en nitrógeno combinado.

El grupo de bacterias al que se conoce colectivamente como *Rizobios*, inducen en las raíces (o en el tallo) de las leguminosas la formación de estructuras especializadas, los nódulos, dentro de los cuales el nitrógeno gaseoso es reducido a amonio. Se estima que este proceso contribuye entre el 60-80 % de la fijación biológica de nitrógeno.

En esta simbiosis en los nódulos, la planta huésped obtiene nutrientes nitrogenados de la bacteria y ofrece a ésta una fuente de carbono y un ambiente favorable para fijar nitrógeno. La simbiosis contribuye con una parte considerable del nitrógeno combinado en la tierra y permite a las plantas leguminosas crecer sin fertilizantes nitrogenados y sin empobrecer los suelos (Wang et al. 2001).

5.6 Fijación de Nitrógeno

(Nadal, et al.2004). Cita que: El hecho que el cultivo de leguminosas enriquece el terreno ha sido conocido desde años antiguo, habiéndose derivado del mismo la técnica de alternar cultivos de año en año siguiendo rotaciones en las que obligadamente interviene una leguminosa.

Hasta la mitad del siglo pasado no se supo, sin embargo, la acción fertilizante de las leguminosas se debía principalmente al notable incremento en nitrógeno que experimentaba el suelo en el que habían sido cultivadas.

La demostración concluyente de que ello es debido a la asimilación de nitrógeno atmosférico realizado por ciertas bacterias (*Rhizobium spp*) que viven en simbiosis con las leguminosas formando nudosidades en sus raíces fue realizada a lo largo del siglo XIX. El proceso bioquímico de la fijación de nitrógeno aún está en estudio a pesar de enormes avances conseguidos.

La cantidad de nitrógeno liberado por las bacterias radicícolas depende del suelo, de las condiciones del cultivo e incluso de la variedad.

5.7 Los Rizobios

La fijación biológica de nitrógeno la realizan algunos organismos que pueden aprovechar directamente el nitrógeno del aire a través de bacterias, formando nódulos. Los nódulos son unas estructuras radiculares resultantes de la simbiosis entre la planta y la bacteria. Estas bacterias forman parte de la denominada rizosfera, que es una zona de interacción única y dinámica entre raíces de plantas y microorganismos del suelo.

La comunidad de la rizosfera consiste en un microbiota (bacterias, hongos y algas) y una microfauna (protozoos, nematodos, insectos y ácaros). Las bacterias en simbiosis con una planta hospedante fijan el nitrógeno del aire, es decir, originan compuestos solubles por las plantas (Taiz & Zeiger, 2006).

5.7.1 Proceso de Nodulación

Las leguminosas secretan compuestos específicos que atraen a los *Rizobios*, entre estos compuestos se encuentran flavonoides y en respuesta a ellos los *Rizobios* activan una serie de genes implicados en la nodulación.

El primer paso en la formación de los nódulos es la adherencia de la bacteria a la planta. En la superficie del *Rizobios* se localiza una proteína específica de la adherencia, la ricadesina, es una proteína que se une al calcio y puede actuar captando complejos de calcio en la superficie de los pelos radicales. Otras sustancias, como las lectinas, que son proteínas que contienen carbohidratos, también cumplen una función en la adherencia planta-bacteria.

Después de la unión, los pelos radicales se enroscan debido a la acción de sustancias específica secretadas por la bacteria, que se conocen como factores NOD (Factores de nodulación).

Algunos pelos radicales se enroscan hasta 360 ° formando una estructura a la que se llama "cayado de pastor". La bacteria penetra entonces en el pelo radical e induce la formación por parte de la planta de un tubo de composición similar a la pared celular. A continuación, la infección alcanza a las células de la raíz adyacentes a los pelos radicales y los factores NOD estimulan la división de las células vegetales, produciendo finalmente el nódulo (Wang et al. 2001).

5.7.2 Inoculantes

La formulación de inoculantes a partir de *Rizobios* es una biotecnología viable, que mediante su aplicación en la semilla o al suelo directamente, contribuye a incrementar los rendimientos agrícolas en leguminosas de interés como el frijol común. Esto gracias al proceso de la fijación biológica del nitrógeno, donde se incorporan tasas adecuadas de nitrógeno a las plantas y a la par favorece la reducción de la aplicación de fertilizantes químicos.

Varios estudios se han llevado a cabo y en todos los casos, mediante la inoculación de cepas seleccionadas de *Rizobios* como inoculantes se lograron conseguir rendimientos iguales o superiores cuando se comparó con la adición de fertilizantes nitrogenados.

Hoy existen muchas formas de cultivar a los *Rizobios* y diversos soportes posibles, las distintas combinaciones entre ellos abren un abanico de posibilidades en las formulaciones de los inoculantes. Además, la elección de un inoculante va a determinar en parte el método de su aplicación al cultivo (Granda, 2017).

5.7.3 Producción de Inoculantes

(Hubbell, 2017) Cita: La producción de inoculantes empieza con la obtención de cepas de *Rhizobium* que son muy infectivas para la planta huésped; capaz de formar muchos nódulos en la raíz lo más pronto posible después de la germinación de la semilla y altamente efectiva; capaz de fijar nitrógeno atmosférico a un nivel bastante alto.

En los casos en los cuales las leguminosas se encuentran ya en el suelo, existe la posibilidad de que cepas buenas para inoculantes estén presentes. Sin embargo, estas cepas varían bastantes entre sus características simbióticas. Por lo tanto, es altamente recomendable tratar de aislar y evaluar esas cepas en cuanto a su potencial como inoculantes.

Frecuentemente se encuentra que algunas cepas son superiores debido a que se han adoptado condiciones ambientales que son únicas para ese suelo; tales como PH, temperatura, niveles de nutrientes, humedad y toxicidad de aluminio.

Después de una purificación rigurosa, cada cepa es evaluada por su infectividad y efectividad en asociación con la planta huésped original de la cepa. Existen varios métodos para tales evaluaciones, pero todos ellos necesitan la característica de poder excluir cualquier posible contaminación de la planta huésped con cepas de *Rhizobium* que no son las que están siendo evaluadas.

5.8 Medios de Cultivos Artesanales

El medio de cultivo artesanal API (sustrato a base de plantas medicinales) posee características que permite el desarrollo y multiplicación de *Rhizobium*, estos sustratos tienen la función de suministrar a los microorganismos enzimas, minerales y azúcares los cuales son aprovechados al máximo para poder permitir su multiplicación de forma satisfactoria.

El uso de este sustrato se retoma desde experiencias de los productores al utilizar ciertas plantas como en raizador natural, dado esta experiencia se incorporó el uso de sábila, orégano y sacarosa como una fuente de energía a la multiplicación de *Rhizobium*.

El medio de cultivo artesanal a base de FRIJOL posee minerales, hormonas, carbohidratos y antioxidantes, este sustrato se mejoró con la incorporación de sacarosa ya que proporciona a los microorganismos la energía para su multiplicación.

5.9 Sustratos

(Avenza, 2018) Define que: El sustrato es todo material sólido, distinto del suelo, natural, de síntesis o residual, mineral u orgánico, que, colocando en un contenedor o en el propio suelo, en forma pura o mezclada, permite el anclaje de las raíces y el desarrollo de las plantas. Cualquier sustrato puede intervenir o no en el complejo de la nutrición mineral de la planta.

5.9.1 Características de los Sustratos

Los sustratos o suelos deben tener una serie de características idóneas para mejorar el enraizamiento y el crecimiento de la planta que alberguen.

5.9.2 Estabilidad física

Esta característica es de vital importancia en los cultivos, ya que la compactación y descomposición del sustrato causa la reducción de poros, lo que conlleva la disminución de la capacidad de aireación.

Lo más idónea es que un sustrato se degrade y descomponga muy lentamente. Se tendrá mucho cuidado con los materiales que se rompen fácilmente por el agua, ya que no es aconsejable que las partículas que forman el sustrato tengan dilatación o contracción, porque podrían causar cambios en el volumen.

La falta de estabilidad hace que el sustrato se aparte de las paredes del contenedor, dificultando la rehidratación. La descomposición de las partículas en otras más pequeñas provoca la ocupación de los poros y cambios de volúmenes.

5.9.3 Aireación

La aireación consiste en que la raíz pueda “respirar” es decir que pueda coger oxígeno. Para ello es necesario tener sustratos porosos y una estructura estable.

La aireación adecuada rondaría el 30% del sustrato (proporción del volumen de oxígeno disponible) y se haría la comparación después de haber saturado de agua el sustrato y que hubiera drenado.

5.9.4 Capacidad de retención de agua

Un sustrato que tenga una elevada porosidad tendrá potencialmente una buena aireación y retención de agua; Puede no ser suficiente que la cantidad total de agua contenida en el sustrato sea la necesaria para la planta, pero tampoco puede negar la zona para ahorrar riesgos, ya que perdería la capacidad de aireación. Habrá que tener en cuenta que, a mayor capacidad de retención de agua, menor riesgo.

5.10 Tipos de Sustratos

- a) **Sustrato artesanal con cascarilla de arroz:** Es una combinación de Lombrihumus con cascarilla de arroz quemada. Este sustrato ayuda a que la planta pueda conservar la humedad.
- b) **Lombrihumus:** Es un sustrato obtenido por la descomposición de la materia orgánica realizada por lombrices, estiércol y desechos vegetales.

- c) **Suelo:** para elaborar un sustrato a base de suelo buscamos suelos que se encuentren conservados o en descanso que se encuentre rodeado de material orgánico en descomponían.
- d) **Lombrihumus con cascarilla de coco:** Es la combinación de lombrihumus con cascarilla de coco, estos dos sustratos combinados permiten que la humedad pueda conservarse por más tiempo.
- e) **Turba:** Es un material orgánico, de color oscuro y rico en carbono. Está formada por una masa esponjosa y ligera en la que aún se aprecian los componentes vegetales.

5.11 Método de multiplicación (Biorreactor)

(Gallindo et al. 2007) Define que: El fermentador o Biorreactor, que es el recipiente en donde se promueve el crecimiento de organismos para la síntesis de diversos productos biotecnológicos.

La función principal de un fermentador es la de proveer un ambiente controlado para alcanzar el crecimiento y la formación óptima de productos, o ambos. Además, el fermentador tiene como objetivo garantizar una condición estéril, que permita únicamente el cultivo de la especie biológica de interés.

5.12 Programas estadísticos

5.12.1 Análisis de varianza (ANDEVA)

ANDEVA es una técnica estadística que evalúa las diferencias potenciales en una variable dependiente de nivel, de escala mediante una variable de nivel nominal que tiene 2 o más categorías.

Por ejemplo, un ANDEVA puede examinar las posibles diferencias en los puntajes de coeficiente intelectual por país. Desarrollada por Ronald Fisher en 1918, esta prueba extiende la prueba t y la prueba z que tiene el problema de permitir que solo la variable de nivel nominal tenga dos categorías. Esta prueba también se denomina análisis de varianza de Fisher.

El uso de ANDEVA depende del diseño de la investigación. Normalmente, se utilizan de tres formas: **de una vía, de dos vías y de N vías** (Statistic solutions, 2013).

5.12.2 Diseño Factorial sin replica

Al aumentar el número k de factores en un diseño 2^k , el número de combinaciones aumenta y resulta económicamente costoso realizar réplicas que permitan estimar el error para poder hacer los contrastes pertinentes.

Lo habitual es que sean los factores principales y las interacciones de bajo orden los que realmente influyen sobre la variable respuesta, se utiliza como recurso asumir que las interacciones de orden alto son nulas, con lo que disminuye el número de parámetros a estimar, lo que permite utilizar parte de las observaciones para estimar el error; en base a esta estimación se ejecutan los contrastes (TecnoStarts, 2016).

5.12.3 Prueba de Tukey

La prueba de Tukey es un método que tiene como fin comparar las medias individuales provenientes de un análisis de varianza de varias muestras sometidas a tratamientos distintos, este test nos permite discernir si los resultados obtenidos son significativamente diferentes o no.

En los experimentos donde se compara entre tres o más tratamientos diferentes aplicados a igual número de muestras, se requiere discernir si los resultados son significativamente distintos o no.

Se dice que un experimento es balanceado cuando el tamaño de todas las muestras estadísticas es igual en cada tratamiento. Cuando el tamaño de las muestras es diferente para cada tratamiento, se tiene entonces un experimento no balanceado.

La prueba de Tukey no es única, existiendo muchas más pruebas para comparar medias muestrales, pero esta es una de la más conocidas y aplicadas (Pérez, 2020)

5.12.4 Software JMP

JMP es una herramienta interactiva de visualización de datos y análisis estadísticos. Que permite explorar, analizar, investigar patrones ocultos y mostrar gráficamente datos y resultados interactuando mediante tablas de datos, gráficos, diagramas e informes.

JMP permite a los investigadores crear una amplia variedad de análisis estadísticos y modelizaciones. También resulta útil para los analistas de negocio que deseen descubrir rápidamente tendencias y patrones presentes en datos.

JMP se puede utilizar para:

- Crear diagramas y gráficos interactivos para explorar datos y descubrir relaciones.
- Descubrir patrones de variación con múltiples variables a la vez.
- Explorar y resumir grandes cantidades de datos.
- Desarrollar modelos estadísticos potentes para predecir el futuro

(Aguilera, 2008).

5.12.5 Software Rbio

Rbio es un software para el procesamiento de datos, es compatible e integrado con el software R, aceptado mundialmente para análisis estadísticos. Por tanto, Rbio aprovecha todo el potencial del procesamiento del software R. sin embargo Rbio permite al usuario realizar todos los análisis sin conocer la programación en lenguaje R.

Rbio puede realizar estadísticas descriptivas, análisis de varianza, estimación de parámetros genéticos y pruebas de medias, análisis multi-variantes, pruebas no paramétricas, regresiones, correlaciones, biometría y bioinformática.

Los archivos de salida del software Rbio son fáciles de usar, ya que presentan todos los significados de las pruebas estadísticas e indican cómo interpretar los valores. Además, las pruebas de medias ya muestran todas las letras que indican las diferencias entre las medias, lo que convierte al Rbio en un excelente software para usuarios que acaban de empezar a trabajar con análisis de datos (Bhering, 2017).

5.12.6 Software Genes

Genes es un software para el análisis y procesamiento de datos utilizando diferentes modelos biométricos. Su uso de gran utilidad en estudios genéticos ya que permite la comprensión del comportamiento biológico.

También se integra con el software libre R y la aplicación Matlab, mediante la provisión de scripts útiles para análisis complementarios en varias áreas, incluida la amplia selección genómica, la predicción de valores genéticos y biológicos (Maringá, 2013).

VI. HIPÓTESIS

6.1 Hipótesis de Investigación (Hi):

Hi: Los medios artesanales API Y FRIJOL son eficientes para la producción de nódulos de *Rhizobium* como fijador atmosférico en el cultivo de frijol.

6.2 Hipótesis Nula (H0):

H0: Los medios artesanales API y FRIJOL no son eficientes para la producción de nódulos de *Rhizobium* como fijador de nitrógeno atmosférico en el cultivo de frijol.

6.3 Hipótesis Alternativa (Ha):

Ha: Al menos uno de los medios artesanales API y FRIJOL tendrá una mejor eficiencia para producción de nódulos de *Rhizobium* en el cultivo de frijol.

VII. DISEÑO METODOLÓGICO

7.1 Tipo de Investigación

7.1.1 Según el enfoque de la investigación

El trabajo tiene un enfoque mixto, ya que en este proceso se recolectó, analizó y vehicularon datos cuantitativos y cualitativos en un mismo estudio para obtener un sustrato artesanal y medios líquidos más eficientes y poder crear una alternativa a bajos costo de producción de *Rhizobium*.

7.1.2 Según el alcance de los resultados

La investigación es de carácter Experimental porque se realizaron registros y análisis de las variables durante la etapa de laboratorio y etapa de floración del cultivo.

7.1.3 Según el tiempo de ocurrencia

La investigación fue Prospectiva, ya que el análisis se ejecutó durante todo el proceso de preparación de sustratos artesanales y medios líquidos que fuesen más eficientes para la obtención de un producto final a base de *Rhizobium* que servirá de alternativa artesanal fijadora de Nitrógeno al suelo.

7.1.4 Según el período en que se realiza el estudio

Se efectuó en un momento determinado del tiempo, la investigación fue de corte transversal, ya que se realizó en el período comprendido del mes de junio del 2018 iniciando con la **fase I**: depuración de medios artesanales finalizando en diciembre del mismo año, **fase II y III** iniciando en febrero del 2019 hasta Julio del mismo año evaluando establecimiento en sombreadero y evaluación de sustratos artesanales en estado controlado y no controlado, **fase IV**: Iniciando en septiembre del 2019 y finalizando enero 2020 donde se realizó evaluación de biorreactores.

7.2 Descripción de la Zona

La investigación se llevó a cabo en el laboratorio de biotecnología para la inoculación y producción de nódulos de *Rhizobium*, así como también la comparación de la eficiencia de sustratos artesanales en sombreadero del Centro nacional de investigación Agropecuaria (INTA/CNIA).

7.2.1 Localización

El Centro Nacional de Investigación Agropecuaria se encuentra ubicada en la ciudad de Managua km 14 ½ carretera norte, dos km al sur se ubica entre las coordenadas 12°05' de latitud norte y 86°9' de longitud oeste, con una elevación de 56 msnm.

El Departamento de Managua se encuentra en las coordenadas 12°8'N 86°15'O.



Figura 4: Micro Localización.



Fuente: Google Maps, 2020.

7.2.2 Condiciones Climáticas

La temperatura del municipio oscila de entre 22.12 °C y 36.2 °C. La precipitación promedio anual es de 1,134.5 mm. En la época lluviosa promedia 1121.5 mm y en la época seca un promedio de 13 mm. Presenta un período canicular comprendido entre julio y agosto.

7.3 Fases en las que se dividió el estudio

El estudio se llevó a cabo en cuatro fases las cuales se describen a continuación:

Fase 1: Tiene la finalidad de determinar el crecimiento de dos cepas de *Rhizobium* en medios de cultivos líquidos que se llevó a cabo en laboratorio. Donde se seleccionaron los medios artesanales líquidos para las siguientes fases.

Fase 2 y Fase 3: Tiene la finalidad de estimar la eficiencia de los medios solidos combinados con medios líquidos aplicándolos en el cultivo de frijol llevado hasta la etapa de floración.

Fase 4: Tiene la finalidad de definir una técnica adecuada para la reproducción de *Rhizobium* como alternativa al pequeño productor.

7.4 Metodología para la determinación del crecimiento de dos cepas de *Rhizobium* en medios de cultivos líquidos bajo condiciones controladas

Se colocó en un agitador durante 8 días los medios artesanales API (Es un medio realizado a base de plantas medicinales), FRIJOL (Destilado de Frijol) y el medio testigo YMA (Yeast Mannitol Agar) inoculados con las cepas CIAT899 y CR477 Estos medios líquidos iban acompañados de un control, el cual no tenía bacteria de *Rhizobium* el cual nos ayudaría a descartar algún agente contaminante duran el tiempo de agitación.

Se tomaron las muestras de ambos medios cada dos días y se realizaron conteo de individuos con la ayuda de un microscopio, utilizando la siguiente formula:

$$(Prom. Segmento * 250,000 * Factor de dilución)$$

Dónde:

Prom.Segmento = Suma total de los segmentos leídos en microscopio dividido entre el número de segmentos.

250,000 = Cámara de contaje Neubauer

Factor de dilución = 0.003 (Secuencia en la que se reduce la concentración) siendo leído en tubo 3 donde $(\frac{1}{1000} = 0.001)$

Se realizó la prueba de gota con un gotero de diámetro 0.04μ donde se obtuvo la formación de colonias y se debe de esperar dos días para poder observarlas luego se aplica la siguiente fórmula:

$$\left(Prom. colonia * \frac{1}{Volumen de gota} * Factor de dilución \right)$$

Donde;

Prom.colonia = Total de gotas obtenidas en platos

Volumen de gota = total de gotas obtenidas en un 1 ml ($\frac{1}{27} = (0.04)$)

Factor de dilución = Secuencia en la que se reduce la concentración [siendo leído en tubo 6 donde ($\frac{1}{1000000} = 0.0000001$)]

Por medio de esta fórmula se logra identificar las unidades formadoras de colonias (UFC). Estas dos variables ayudaron a conocer el punto máximo (en días) del crecimiento de la bacteria (Somasegaran & Hoben, 1985).

7.5 Metodología para la estimación de la eficiencia de los medios sólidos combinados con medios líquidos

Se estableció bajo sombreadero el cultivo de frijol, utilizando la variedad INTA Fuerte Sequía, se seleccionaron dos cepas de *Rhizobium* (CIAT 899 Y CR 477) y dos medios líquidos artesanales: API y FRIJOL, se combinaron con cinco sustratos sólidos:

1. Lombrihumus (LH)
2. Lombrihumus con cascarilla de coco (LH/CC)
3. Suelo
4. Sustrato artesanal con cascarilla de arroz (SA)
5. Turba

Este proceso se conoce como inoculación a sustratos sólidos. Una vez inoculado el sustrato se procedió a realizar la inoculación a la semilla de frijol con cada uno de los sustratos sólidos y se procedió a sembrar en maceteras para un total de cinco repeticiones por tratamiento:

Tabla 2. Combinación de medios de cultivos líquidos y sustratos solidos con cepas

	CEPA1/MEDIO 1	CEPA 2/MEDIO 1	CEPA 1 / MEDIO 2	CEPA 2 / MEDIO 2
S1	LH+API+CIAT 899	LH+API+CR 477	LH+FRIJOL +CIAT 899	LH+FRIJOL +CR 477
S2	LH/CC+API+CIAT 899	LH/CC+API+CR 477	LH/CC+FRIJOL+CIAT 899	LH/CC+FRIJOL+CR 477
S3	SUELO + API+ CIAT 899	SUELO + API+ CR 477	SUELO + FRIJOL+ CIAT 899	SUELO + FRIJOL+ CR 477
S4	SA + API+ CIAT 899	SA + API+ CR 477	SA + FRIJOL + CIAT 899	SA + FRIJOL + CR 477
S4	TURBA + API + CIAT 899	TURBA + API + CR 477	TURBA + FRIJOL+ CIAT 899	TURBA + FRIJOL+ CR 477
TESTIGO	SEMILLA SIN INOCULAR	SEMILLA SIN INOCULAR	SEMILLA SIN INOCULAR	SEMILLA SIN INOCULAR

Fuente: Propia apartir de combinación de sustratos y cepas

A partir de la primera semana de germinación se tomaron los siguientes datos (altura de la planta y diámetro del tallo), cuando el cultivo llego a etapa de floración se sometió a estrés hídrico por una semana con el objetivo de extraer las raíces completas y extraer los nódulos con el propósito de completar la investigación tomando datos de las siguientes variables:

- **Peso fresco de la planta aérea:** Después de retirar las plantas se dejó secando al aire libre para ser tomado el peso seco en una pesa digital.
- **Peso seco de la planta aérea:** se retiró la parte aérea de la planta y se pesó con ayuda de una pesa digital.
- **Largo de raíz:** Se extrajo la raíz de la planta y con ayuda de una cinta métrica se tomó el largo de raíz.
- **Peso seco de raíz:** Se extrajeron los nódulos de las raíces y se lavaron las raíces y se dejó secando por 24 horas para luego pesarla con ayuda de una pesa digital.
- **Total de nódulos:** Se extrajeron los nódulos de las raíces y se contabilizaron.
- **Peso de nódulos:** Se tomó el total de nódulos por raíz y tratamiento y se pesaron con ayuda de una pesa digital.
- **Diámetro de nódulos:** Con ayuda de un vernier digital se tomó el diámetro de los nódulos.

Al momento que la semilla fue inoculada con la bacteria se tomó una muestra de 50 gr de cada sustrato sólido haciendo dos repeticiones de las muestras para dejar una en cuarto frío con una temperatura de 4 °C y otra en estado ambiente con una temperatura \pm 24 a 28 °C, con el objetivo de determinar la sobrevivencia y multiplicación de la bacteria a diferentes condiciones.

De la muestra de 50 gr se tomó 1 gr de cada sustrato ya inoculado con frecuencia de una vez por semana, para determinar la sobrevivencia de los individuos se procedió a realizar diluciones seriadas, con ayuda de cámara de recuento o hemacitómetro y microscopio, se realizó conteo de individuos utilizando lente 40x, posteriormente se realizó siembra de la bacteria de cajas Petri de vidrio con medidas 100mm x 15mm segmentados, depositando una gota en cada segmentó con el objetivo de obtener unidades formadoras de colonias.

7.6 Metodología para definir una Técnica de reproducción de *Rhizobium*

Convencionalmente se ha hecho la multiplicación de *Rhizobium* con un equipo llamado agitador eléctrico, pero este equipo tiene un alto costo lo cual dificulta la multiplicación artesanal para el pequeño productor.

Por tal razón se aplicó el modelo artesanal mediante el uso de un biorreactor bajo condiciones ambientales controladas tales como: temperatura controlada bajo aire acondicionado a 25 °C, pH de 6.8 controlado por medio de un pH-metro digital y agitación por medio de una bomba de pecera con una capacidad de 50 litros regulado a velocidad media de agitación.

Para el uso del biorreactor se adaptó un recipiente estéril donde colocamos las mangueras para obtener entrada y salida de aire. Para la salida de aire se colocó un filtro que permite la salida del aire sin que, entre algún agente contaminante, en la entrada de aire se colocó la bomba de pecera que al entrar el aire simula la agitación del medio líquido.

Una vez teniendo instalado el biorreactor utilizamos los medios líquidos API, FRIJOL y YMA inoculados con las cepas CIAT 899 y CR 477, para determinar la

efectividad del biorreactor se pusieron los mismos medios líquidos inoculados en agitador, tomando una muestra diaria durante 5 días partiendo del día cero para realizar conteo de individuos, unidades formadoras de colonias y oxígeno disuelto (O.D).

7.7 Operacionalización de variables

- a) **Conteo de individuos (Bacteria de *Rhizobium*):** Se realizó conteo de individuos con ayuda de un microscopio lente 40x y cámara de recuento a los medios líquidos inoculados con cepas de *Rhizobium* antes mencionados, esta variable fue utilizada en diferentes procesos a lo largo de la investigación.
- b) **Conteo de colonias:** se realizó la siembra de bacteria en cajas Petri segmentado ubicando una gota por segmento este procedimiento se le llama método de prueba de gota y sirve para obtener las unidades formadoras de colonias, así mismo fue utilizada para diferentes procesos a lo largo de la investigación.
- c) **Altura de la planta:** A partir de la germinación de la semilla se tomó la altura de la planta una vez por semana hasta la etapa de floración.
- d) **Diámetro de la planta:** a partir de la germinación de la semilla se tomó el diámetro del tallo con ayuda de un vernier digital.
- e) **Peso de fresco de la parte aérea de planta:** Cuando la planta comenzó a florecer se retiró la planta y se tomó el peso fresco de la planta.
- f) **Peso seco de la parte aérea de la planta:** Después de obtener la variable anterior se dejó secar a temperatura ambiente por 10 días hasta obtener el peso seco.
- g) **Peso seco de raíz:** Después de la extracción de nódulos se lavaron las raíces y se dejó secando por 24 horas y se tomó el peso seco.

- h) **Número de nódulos:** Al llegar a la etapa de floración se extrajeron cuidadosamente las raíces donde se retiraron los nódulos de la raíz y se presidió a contaron.
- i) **Diámetro de nódulos:** Una vez que se extrajeron los nódulos de las raíces se midió el diámetro de cada uno de ellos.
- j) **Peso total de nódulos:** Con ayuda de una balanza digital se obtuvo el peso total de nódulos por tratamiento.

VIII. ANÁLISIS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS

En esta parte se presentan los resultados obtenidos de las cuatro fases de la investigación. En la primera fase se midió el crecimiento de dos cepas de *Rhizobium* en tres medios de cultivos líquidos.

En la segunda fase se evaluó la sobrevivencia de la bacteria en cinco sustratos artesanales bajo condiciones controladas de humedad y temperatura y en condiciones ambientales por un periodo de cuatro semanas.

La tercera fase consistió en comprobar la eficiencia de dos cepas de *Rhizobium* inoculada en cinco sustratos artesanales en el establecimiento de la simbiosis en el cultivo de frijol.

Finalmente, en la cuarta fase se evaluó la velocidad de multiplicación de las cepas de *Rhizobium* en tres medios de cultivos líquidos con dos métodos de reproducción (Agitación continua y biorreactores).

8.1 Evaluación de medios de cultivo líquidos por día

La eficiencia de un medio de cultivo para la multiplicación de microorganismos como las bacterias, está en dependencia de la concentración y tipos de nutrientes requeridos para su sobrevivencia. El efecto de los medios de cultivos sobre el crecimiento de la bacteria se estimó a través del conteo de individuos a los 2, 4, 6 y 8 días después de la inoculación.

El análisis de varianza demostró que hubo diferencias significativas en el factor día para los diferentes medios y las dos cepas de *Rhizobium* estudiadas (Tabla 3).

Tabla 3. Análisis de varianza y separación de medias para el factor día de la multiplicación de dos cepas de *Rhizobium*

SEPARACIONES DE MEDIAS								
CEPA CR 477			CEPA CIAT 899					
Días	YMA	API	Días	YMA	API	Días	FRIJOL	
4	3983.33 a	2916.667 a	4	13166.67 a	4583.333 a	2	4050 a	
6	1616.667 b	1550 ab	2	2366.667 b	733.3333 b	4	3600 a	
8	650 b	1100 ab	6	150 bc	50 b	6	266.6667 b	
2	283.33 b	533.3333 b	8	66.66667 c	50 b	8	166.6667 b	
p - Valor	< 2e-16***	< 2e-16***	p - Valor	< 2e-16***	< 2e-16***	p - Valor	< 2e-16***	
Media	1633.33175	1061.1111	Media	3937.500918	1354.166575	Media	2020.83335	
CV	0.024978967	0.024469547	CV	0.020068781	0.034453365	CV	0.022632104	
DS	1664.553548	674.1764567	DS	6244.293451	2176.744562	DS	2091.75518	

Fuente: Elaboración propia apartir de los resultados obtenidos en el Software RBio y separaciones de medias por el método de TUKEY

Significado de códigos: 0 **** 0.001 *** 0.01 ** 0.05

Error: 0.05

Los resultados indican que la cepa CR 477 alcanzó el mayor número de individuos a los 4 días de incubación en los medios YMA y API con 3,983.33 y 2,916.667 individuos respectivamente, por lo que la separación de media ubicó a ambos tratamientos en la categoría “a”. Por otra parte, la cepa CR477 obtuvo a los dos días con el medio YMA 283.33 individuos, considerándose como la categoría de menor eficiencia para la multiplicación de esta cepa.

En referencia a lo anterior, el margen de diferencia en el número de individuos se debió posiblemente a que a las 48 horas de incubación de la bacteria en ambos medios de cultivo se iniciaba la tasa de multiplicación exponencial (**Anexos II, gráfico 13 y gráfico 14 pág iii,iv**).

Similarmente, la tabla 3 muestra que el crecimiento de la cepa CIAT 899 alcanzó el mayor número de individuos en los medios YMA y API a los 4 días después de la incubación, con valores de 13,166.67 y 4,583.33, respectivamente. En cambio, el menor crecimiento se presentó después de 8 días de incubación en ambos medios de cultivo.

Por último, el medio de cultivo líquido FRIJOL inoculado con la cepa antes mencionada se destacó por presentar el mayor crecimiento de individuos a los dos días después de la incubación, lo que difiere del resultado en los medios YMA y

API. El análisis también demostró que después del cuarto día de incubación la tasa de multiplicación desciende drásticamente en los tres medios de cultivo.

Para fines de implementar un protocolo de multiplicación de *Rhizobium* utilizando la cepa CIAT 899, es factible utilizar el medio de cultivo líquido FRIJOL por representar la alternativa de menor costo en cuanto al tiempo para alcanzar una tasa de multiplicación óptima para usarse a escala comercial y en cuanto a la disponibilidad de insumos para su preparación.

8.2 Evaluación de la sobrevivencia en sustratos artesanales sólidos bajo condiciones controladas de humedad y temperatura y en condiciones ambientales por un período de cuatro semanas

Esta fase del estudio tiene como importancia brindar una alternativa de sustratos para remplazar a la turba en la producción de inoculantes. Con la aplicación de estos, se contribuirá a la disminución de la fertilización química nitrogenada, impulsando el equilibrio en el ecosistema y contribuyendo a mantener o mejorar los rendimientos, sin provocar deterioro de las capacidades productivas del suelo, lixiviación y eutrofización de fuentes hídricas.

Las cepas de *Rhizobium* deben ser capaces de sobrevivir adecuadamente en el soporte o sustrato utilizado, manteniendo concentraciones por encima del estándar exigido durante el periodo de comercialización (CIAT 1987). La elección cuidadosa del soporte resulta importante para la calidad del inoculante (Ruíz et al. 1979).

Por lo tanto, la función del sustrato es permitir la supervivencia y la fácil manipulación de los rizobios para asociarlos con la leguminosa deseada, deben ser específicos y seleccionados a base de cepas de alta eficiencia, para ser específico y altamente efectivos CIAT (1987) y (La Rosa 1982).

Durante la investigación se evaluaron 5 sustratos artesanales para conocer la capacidad de sobrevivencia de la bacteria en dos condiciones de almacenamiento,

tomando como variables el conteo de individuos y unidades formadoras de colonias.

Tabla 4. Análisis de varianza para las variables de conteo de individuos y unidades formadoras de colonias.

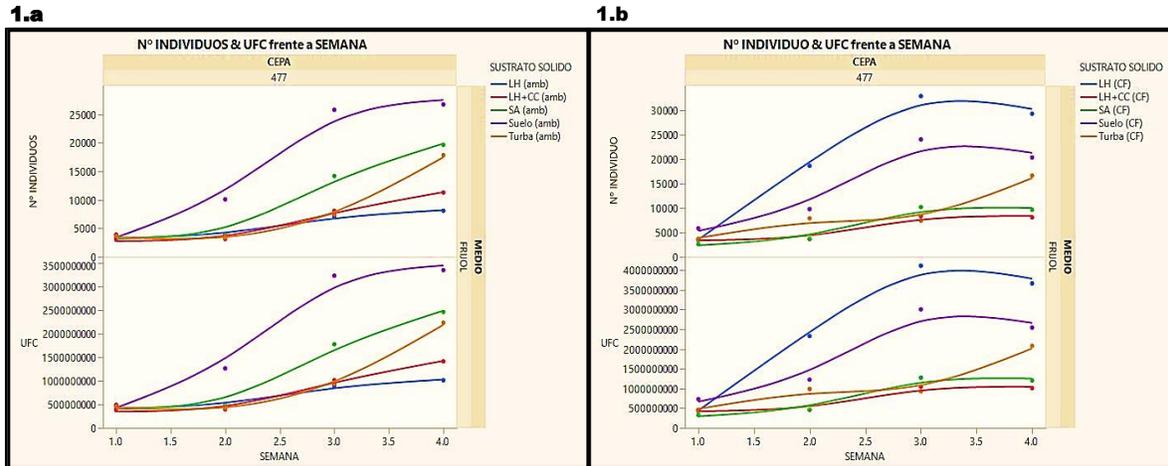
CONTEO DE INDIVIDUOS		UNIDADES FORMADORAS DE COLONIAS	
FUENTE DE VARIACION	P. VALOR	FUENTE DE VARIACION	P. VALOR
Semana	<2e-16***	Semana	2.47e-14***
Medio	0.915073	Medio	0.64757
Cepa	0.032824*	Cepa	0.00078***
Método	0.76214	Método	0.157
Tratamiento	2e-16***	Tratamiento	9.00e-14***
Medio - Cepa	0.025244*	Medio - Cepa	0.01291*
Medio - Cepa - Método - Tratamiento	0.000696***	Medio - Cepa - Método - Tratamiento	0.00508**

Fuente : Elaboración propia apartir de resultados obtenidos en el Software Rbio

Significado de códigos: 0 '****' 0.001 '***' 0.01 '**' 0.05
Error: 0.05

El análisis de varianza (ANDEVA) para las variables conteo de individuos y unidades formadoras de colonias mostró significancia estadística en los factores Semana, Cepa y Tratamiento, así mismo para la interacción Medio – Cepa y para la interacción entre todos los factores. Por lo que se asume que existe un medio líquido, una cepa, un sustrato sólido en una condición de almacenamiento óptimo para la proliferación y sobrevivencia.

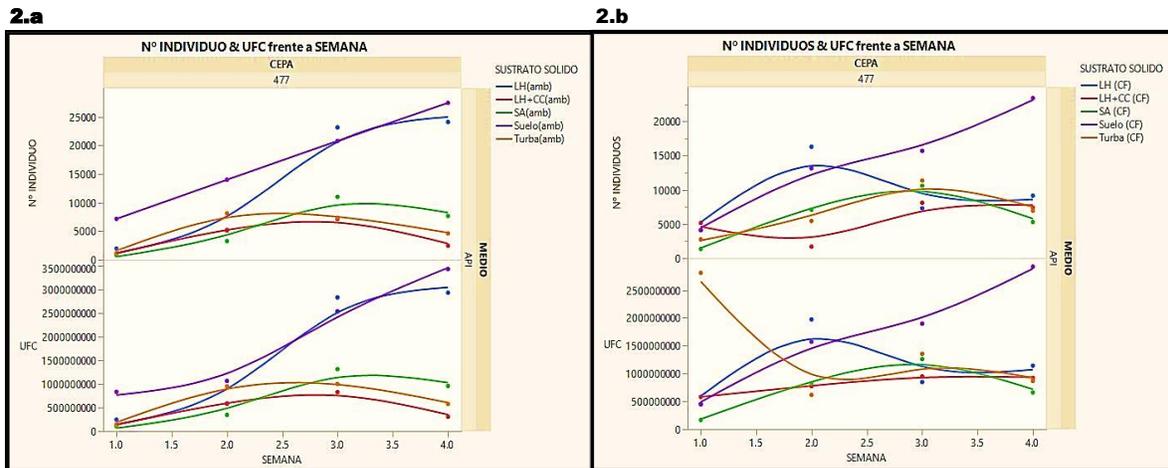
Gráfico 1. Número de individuos y Unidades Formadoras de Colonias del medio líquido FRIJOL y medios sólidos artesanales distribuidos en cuatro semanas de la cepa CR 477.



Fuente: Elaboración propia a partir del Software JMP

Para demostrar el patrón de crecimiento de las cepas en los diferentes sustratos, en el **gráfico de tendencia 1. a** demuestra que la cepa CR 477 multiplicada en el medio de cultivo líquido FRIJOL presentó el mayor crecimiento ascendente en relación a las dos variables, en condiciones normales de crecimiento (temperatura ambiente) en el sustrato sólido “Suelo”. Igualmente, pero bajo condiciones controladas de humedad y temperatura (cuarto frío), el **gráfico de tendencia 1.b** muestra que el crecimiento más alto fue alcanzado con la cepa CR477 en el sustrato sólido “Lombrihumus”.

Gráfico 2. Número de individuos y Unidades Formadoras de Colonias del medio API frente a semana de la cepa CR 477

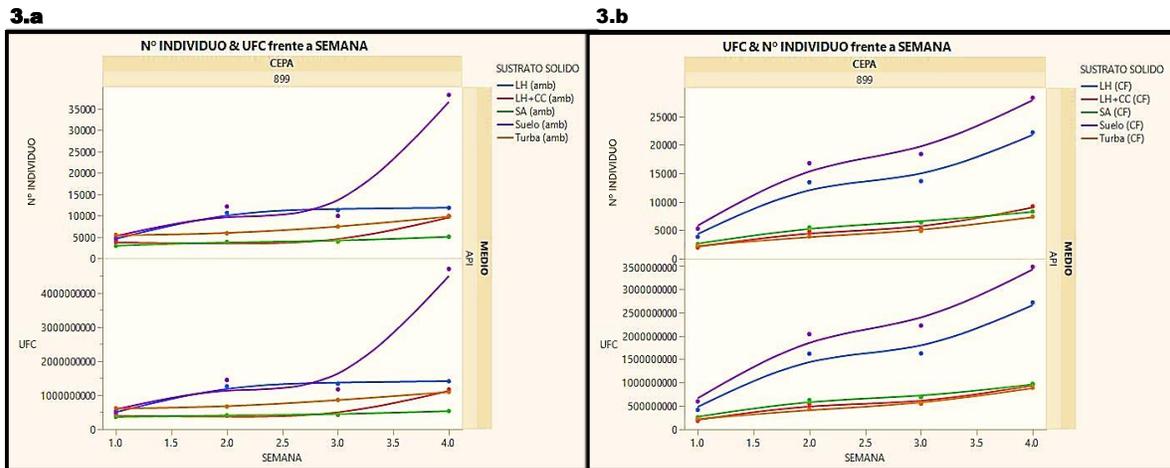


Fuente: Elaboración propia a partir del Software JMP

Bajo esta misma tendencia, **el gráfico 2.a** demuestra que la bacteria CR 477 inoculada al sustrato “Suelo” a partir de medio de cultivo API, posee el mayor crecimiento ascendente durante cada fecha de muestreo para las variables conteo de individuos y unidades formadoras de colonias en condiciones ambientales normales. Sin embargo, entre las semanas 3 y 4 de crecimiento se notó equidad en la tasa de multiplicación de esta bacteria en el sustrato sólido “Lombrihumus” pero, llega a un punto donde su crecimiento decrece, aunque aún muestra superioridad comparado con el resto de sustratos.

Por otra parte, cuando esta cepa se sometió a condiciones controladas de almacenamiento, su crecimiento se mantuvo superior en el sustrato “Suelo” en la misma fuente del inóculo el medio líquido “API” (**Gráfico 2.b**).

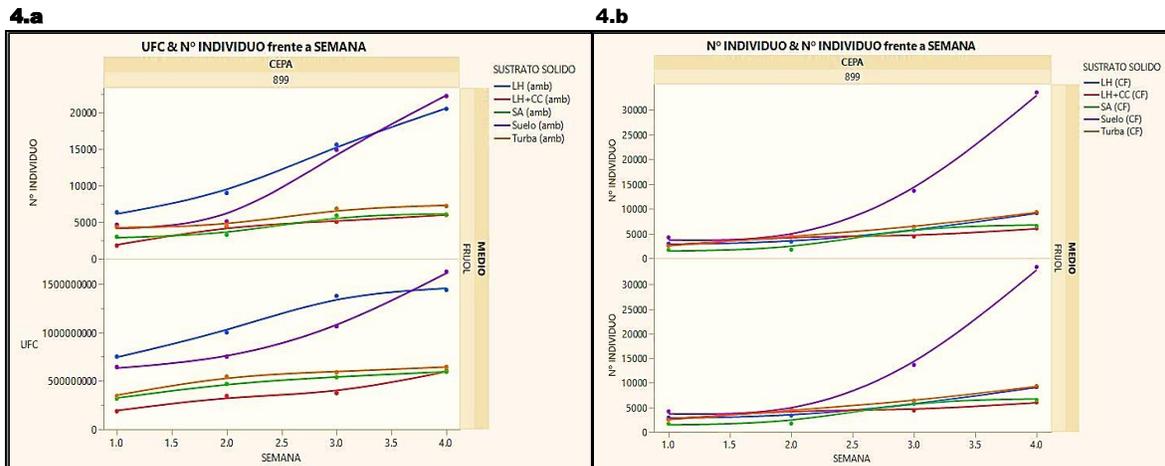
Gráfico 3. Número de individuos y Unidades Formadoras de Colonias del medio API frente a semana de la cepa CIAT 899



Fuente: Elaboración propia a partir del Software JMP

Cuando se evaluó el crecimiento de la cepa CIAT 899 conforme las dos condiciones de almacenamiento, el patrón de crecimiento a temperatura ambiente fue superior en el sustrato “Suelo” cuando este fue inoculado con el medio API (Gráfico 3.a). Demostrando así la utilidad del “Suelo” cuando se desea multiplicar o conservar la bacteria en condiciones de producción de pequeños productores. Simultáneamente, **el gráfico de tendencia 3.b** demuestra que, al evaluar el crecimiento de esta cepa, pero en condiciones controladas, el repunte en su crecimiento lo obtiene también en el sustrato “Suelo” inoculado con medio API. Efecto similar, pero, en menor proporción se presenta cuando se usa el sustrato “Lombrihumus”.

Gráfico 4. Número de individuos y Unidades Formadoras de Colonias del medio FRIJOL frente a semana de la cepa CIAT 899.



Fuente: Elaboración propia a partir del Software JMP

El gráfico 4.a muestra que, al evaluar el comportamiento del crecimiento de esta cepa, pero teniendo como fuente del inóculo el medio líquido FRIJOL, los sustratos que tuvieron el mejor crecimiento fueron “Suelo” y “Lombrihumus”, teniendo siempre superioridad el sustrato “Suelo” conforme el tiempo es mayor. Esta condición se mantuvo mientras el crecimiento se dio en temperaturas ambiente.

Por el contrario, el gráfico 4.b expone que cuando se sometió el crecimiento bajo condiciones controladas fue evidente la superioridad del número de individuos y unidades formadoras de colonias en el sustrato “Suelo”. Nuevamente, se corrobora la versatilidad del uso del sustrato “Suelo” en ambas condiciones de almacenamiento para la cepa CIAT 899.

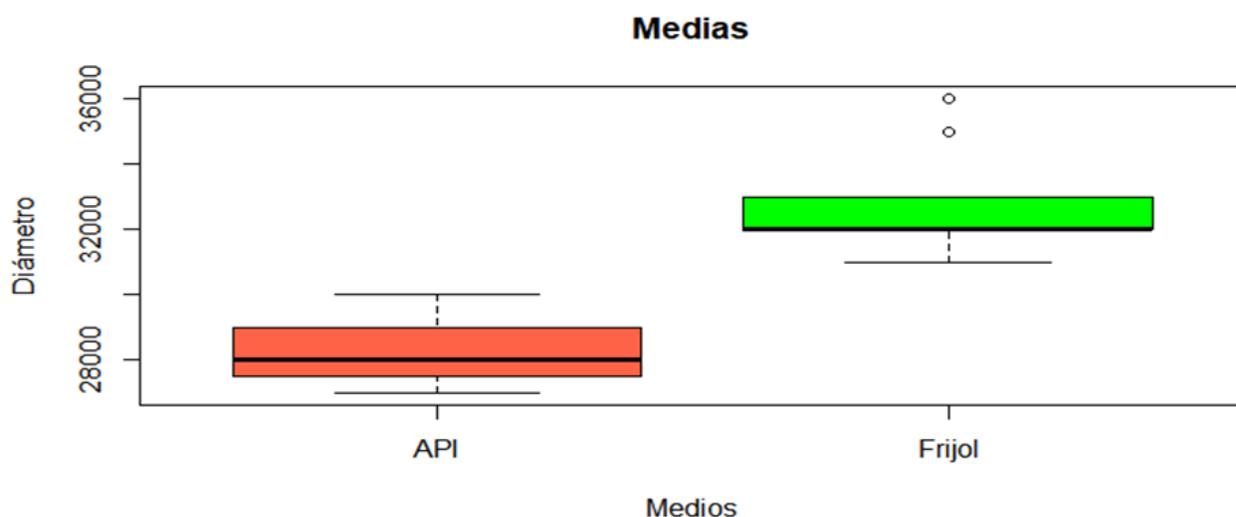
8.3. Evaluación de variables de plantas

La cantidad de nitrógeno fijado por el frijol es muy variada, va en dependencia de la variedad, de la eficiencia fijadora de la bacteria *Rhizobium* y de las condiciones físicas, químicas y biológicas del suelo o del cultivo “*Phaseolus vulgaris*” tiene una amplia diversidad genética y existen grandes diferencias entre los genotipos en la cantidad de nodulación y el nitrógeno fijado. Igualmente, la habilidad para formar

grandes y abundantes nódulos, está también controlada por las bacterias fijadoras de nitrógeno (Ballesteros & Lozano de Yunda).

Los resultados demostraron significancia estadística entre los factores de cada variable sin interacción entre ellos (Anexos I). Comprobando de esta manera la efectividad del uso de *Rhizobium* durante el período de estudio.

Gráfico 5. Test de Tukey para la variable diámetro de la planta en los medios de API y FRIJOL.

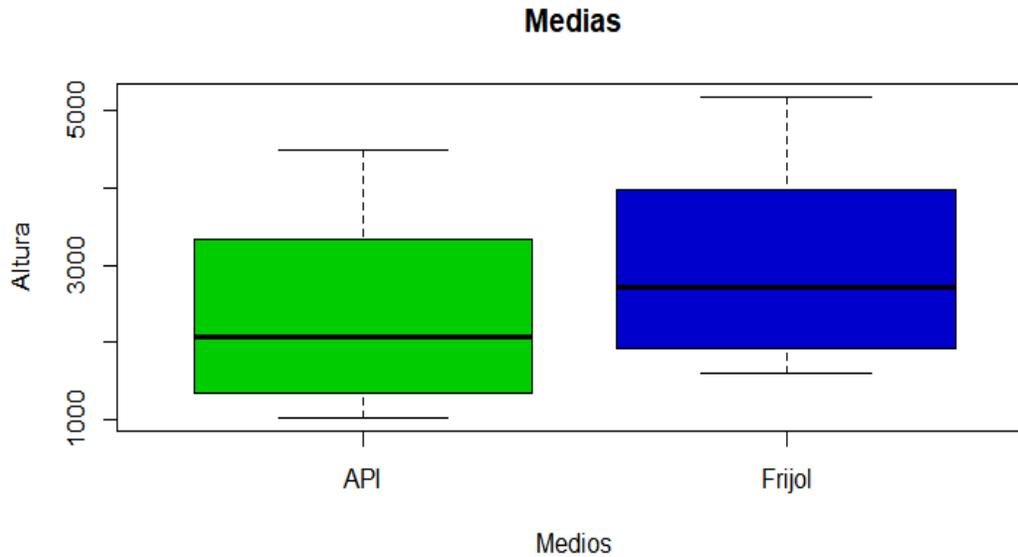


Fuente: Elaboración propia a partir del Software GENES

Para la variable diámetro de planta se presenta un gráfico de box plot o caja de bigote, en el cual se comparan dos categorías (medios de cultivos líquidos API y FRIJOL), puede observarse que la distribución es mayor lo cual esta sesgado de forma positiva para el medio de cultivo líquido FRIJOL, por otra parte, presenta menor diámetro (mediana) y esta sesgado de forma positiva en el medio de cultivo líquido API.

El gráfico no muestra (como es propio de la presentación) cuanto hay en cada tramo de las respectivas cajas. Por lo que se afirma que para esta variable el mejor fue el medio de cultivo líquido FRIJOL.

Gráfico 6. Test de Tukey para la variable altura de la planta en los medios de API y FRIJOL.



Fuente: *Elaboración propia a partir del Software GENES*

Para la variable altura de planta se muestra mediante un box plot o caja de bigote, en el cual se comparan dos categorías (medios de cultivos líquidos API y FRIJOL), puede observarse que la distribución es mayor lo cual esta sesgado de forma positiva para el medio de cultivo líquido FRIJOL, por otra parte, presenta menor altura (mediana) y esta sesgado de forma positiva en el medio de cultivo líquido API.

El gráfico no muestra (como es propio de la presentación) cuanto hay en cada tramo de las respectivas cajas. Por lo que se afirma que para esta variable el mejor fue el medio de cultivo líquido FRIJOL.

Tabla 5. Análisis de varianza para la variable largo de raíz de la planta.

VARIABLE LARGO DE RAIZ	
FUENTE DE VARIACION	P-VALOR
Cepa	0.0
Medio	0.008961
Tratamiento	0.005737
Cepa - Medio - Tratamiento	1.0

Fuente: Elaboración propia apartir de los resultados obtenidos en el Software GENES

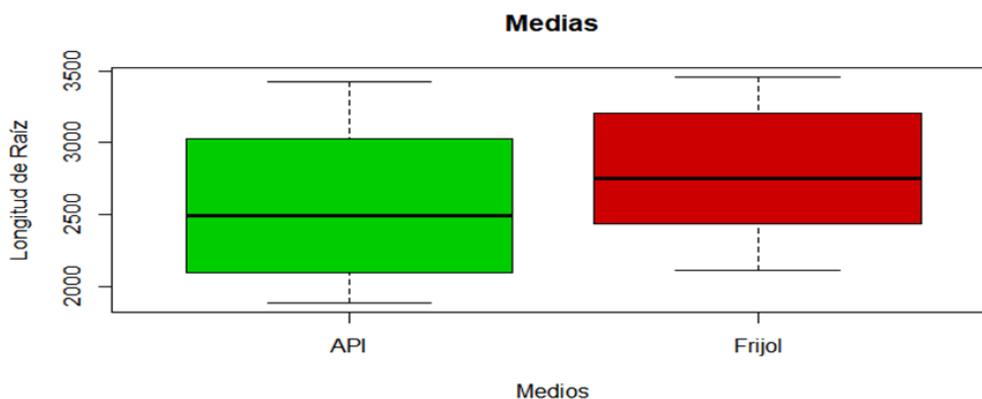
Significado de códigos: 0 '****' 0.001 '***' 0.01 '**' 0.05

Error: 0.05

En la **tabla 7** de análisis de varianza (ANDEVA) con respecto a la variable Largo de Raíz se observa que existe un valor significativo en las fuentes de variación cepa, medio y tratamiento sin interacción entre ellas, lo que significa que existe una cepa, un medio y un tratamiento donde la bacteria tiene una simbiosis positiva que le permite la sobrevivencia y multiplicación.

En los siguientes gráficos se logrará apreciar detalladamente que medio, cepa y tratamiento son los que permiten las condiciones que favorecen el largo de la raíz de la planta.

Gráfico 7: Test de Tukey para la variable longitud de raíz de la planta en los medios API y FRIJOL.

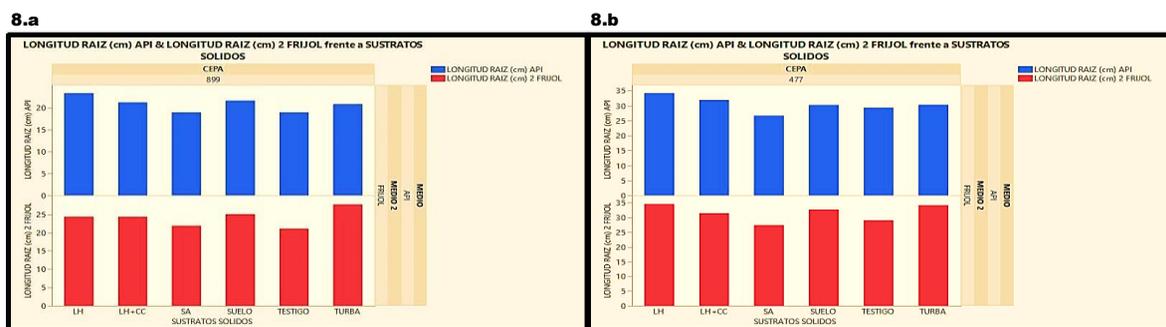


Fuente: Elaboración propia a partir del Software GENES

Para la variable longitud de raíz de la planta se presenta un gráfico de box plot o caja de bigote, en el cual se comparan dos categorías (medios de cultivos líquidos API y FRIJOL), puede observarse que la distribución es mayor lo cual esta sesgado de forma positiva para el medio de cultivo líquido FRIJOL. Por otra parte, el medio de cultivo líquido API presenta menor longitud (mediana) y esta sesgado de forma positiva.

El gráfico no muestra (como es propio de la presentación) cuanto hay en cada tramo de las respectivas cajas. Por lo que se afirma que para esta variable el mejor fue el medio de cultivo líquido FRIJOL.

Gráfico 8. Longitud de raíz del medio API y FRIJOL frente a sustratos de las cepas CR 477 y CIAT 899.



Fuente: Elaboración propia a partir del Software JMP

En el gráfico de barra 8.a Refleja que el sustrato sólido “Lombrihumus” en el medio de cultivo líquido “API, presentó un efecto positivo en la longitud de raíz del cultivo, así mismo “Suelo” presenta condiciones para ser un sustrato alterno. En el mismo gráfico que puede observar que “Turba” en el medio líquido FRIJOL fue el sustrato con mayor compatibilidad entre la bacteria y la raíz de la planta siendo esta la raíz más larga

Los resultados evidencian que la cepa CIAT 899 en los medios de cultivo API Y FRIJOL que los sustratos que producen un efecto a la longitud de la raíz son “Lombrihumus” y “Turba” y tiene en común “Suelo” como un sustrato alterno.

Paralelamente **el gráfico 8.b** se muestra que el medio de cultivo API presta las condiciones para que el sustrato “Lombrihumus” sea un portador eficiente para el mejoramiento de la longitud de raíz de la planta en el mismo gráfico se observa el medio de cultivo FRIJOL donde los sustratos que alcanzaron la mayor longitud de raíz fue “Lombrihumus”.

Para la cepa CR 477 el sustrato “Lombrihumus” es indudablemente el sustrato sólido que permite la relación simbiótica entre la bacteria y la planta.

Tabla 6. Análisis de varianza para la variable total de nódulos de la planta.

VARIABLE TOTAL DE NODULOS	
FUENTE DE VARIACION	P-VALOR
Cepa	0.0127630
Medio	0.103287
Tratamiento	1.0
Cepa - Medio - Tratamiento	1.0

Fuente: Elaboración propia apartir de los resultados obtenidos en el Software GENES

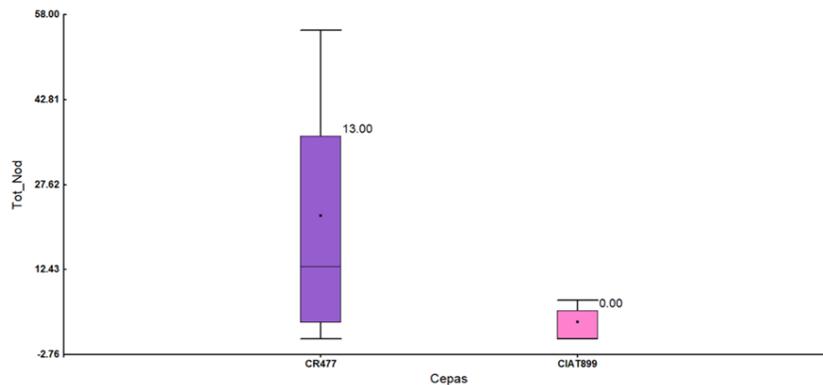
Significado de códigos: 0 '****' 0.001 '***' 0.01 '**' 0.05

Error: 0.05

El análisis de varianza (ANDEVA) muestra que existe una cepa que influye para la producción de nódulos sin embargo no existe una interacción entre los factores por lo que no está limitado a un medio, cepa o tratamiento. Cabe mencionar que la variedad de la semilla juega un papel importante en la fijación de nitrógeno en la planta.

En los siguientes gráficos se logrará apreciar detalladamente que cepa es la que influye en la producción de nódulos.

Gráfico 9. Test de Tukey para la variable total de nódulos de la planta en las cepas CR 477 y CIAT 899.



Fuente: *Elaboración propia a partir del Software GENES*

Para la variable total de nódulos de la planta se presenta un gráfico de box plot o caja de bigote, en el cual se comparan dos categorías (cepas CIAT 899 y CR 477), puede observarse que la distribución esta sesgado de forma positiva para la cepa CIAT 899, por otra parte, la cepa CR 477 presenta mayor nodulación (mediana) y esta sesgado de forma positiva.

El gráfico no muestra (como es propio de la presentación) cuanto hay en cada tramo de las respectivas cajas. Por lo que se afirma que para esta variable la mejor cepa fue **CIAT 477**.

Tabla 7. Escala de nodulación.

CEPA	MEDIO	SUSTRATO SOLIDO	ESCALA DE NODULACION				PESO TOTAL DE NODULOS (mg)
			nódulos pequeños /1mm	nódulos medianos 1-3 mm	nódulos grandes/3mm	Total de nódulos	
477	FRIJOL	LH	55	97	2	154	534.3
		LH+CC	40	56	3	99	201.3
		SA	40	75	4	119	436
		SUELO	4	26	6	36	279.9
		TURBA	21	126	5	152	680
	TESTIGO				0	0	
	API	LH	25	140	34	199	980
		LH+CC	52	323	6	381	1170
		SA	233	485	3	721	2310
		SUELO	177	602	6	785	2690
TURBA		170	511	2	683	1900	
TESTIGO				0	0		
899	FRIJOL	LH	37	32		69	86.2
		LH+CC	20	92	4	116	271.9
		SA	30	20		50	61.1
		SUELO	45	105		150	477
		TURBA	45	38	2	85	178
TESTIGO				0	0		

NOTA: Para el medio Api con la cepa CIAT 899 Ningun sustrato solido tuvo nodulacion,

FUENTE: Elaboración propia a partir de datos obtenidos en sombreadero.

En la tabla 7: Se representa una escala de nodulación, donde se puede observar Diámetro, Peso y Total de nódulos obtenido por sustrato.

Para la cepa CR477 inoculada en el medio de cultivo FRIJOL para el sustrato “Lombrihumus” se obtuvo 154 nódulos con un peso total de 534.3 mg, sin embargo, “Turba” alcanzo 152 nódulos con un peso total de 680 mg, superando el peso de “Lombrihumus”. Para el medio de cultivo API en el sustrato “Suelo” obtiene 785 nódulos con un peso total de 2690 mg, seguido por sustrato artesanal con cascarilla de arroz con 721 nódulos con un peso total de 2310 mg y por último “Turba” siendo este el sustrato que comúnmente es utilizada para la comercialización de *Rhizobium* obteniendo 683 nódulos con un peso total de 1900 mg.

Para la cepa CIAT 899 con medio de cultivo líquido FRIJOL, se obtuvo que “Suelo” es el sustrato que obtuvo mayor número de nódulos con un total de 150 pesando 477 mg, seguido por Lombrihumus con cascarillas de coco con 116 nódulos y un peso de 271.0 mg y “Turba” con 85 nódulos con un peso total de 178 mg. Mientras que con el medio de cultivo liquido API se observó que no existía la

presencia de nódulos, se considera que no hubo formación de nódulos como consecuencia de la reacción entre la cepa y el medio artesanal.

En referencia a lo anteriormente mencionado para el beneficio de la leguminosa durante su cultivo; el mejor medio de cultivo líquido durante el estudio realizado fue API inoculado con la cepa CR477 por medio del sustrato sólido “Suelo”.

8.3 Evaluación del biorreactor

Esta evaluación se llevó a cabo durante la cuarta fase en el laboratorio. Donde se instaló un biorreactor y se comparó con un agitador, tomando como variables conteo de individuos y unidades formadoras de colonias. También se tuvo la oportunidad de realizar la prueba de oxígeno disuelto, la cual ha permitido identificar con precisión la cantidad de bacterias presentes en los medios líquidos.

Tabla 8. Análisis de varianza para la variable oxígeno disuelto.

VARIABLE OXÍGENO DISUELTO	
FUENTE DE VARIACION	P-VALOR
Día	1.33e-88***
Concentración	0.001184**
Medio	2.97e-07***
Método	0.000494***
Medio - Método	0.04618*
Concetración - Cepa	0.042975*

Fuente: Elaboración propia apartir de los resultados obtenidos en el Software RBio

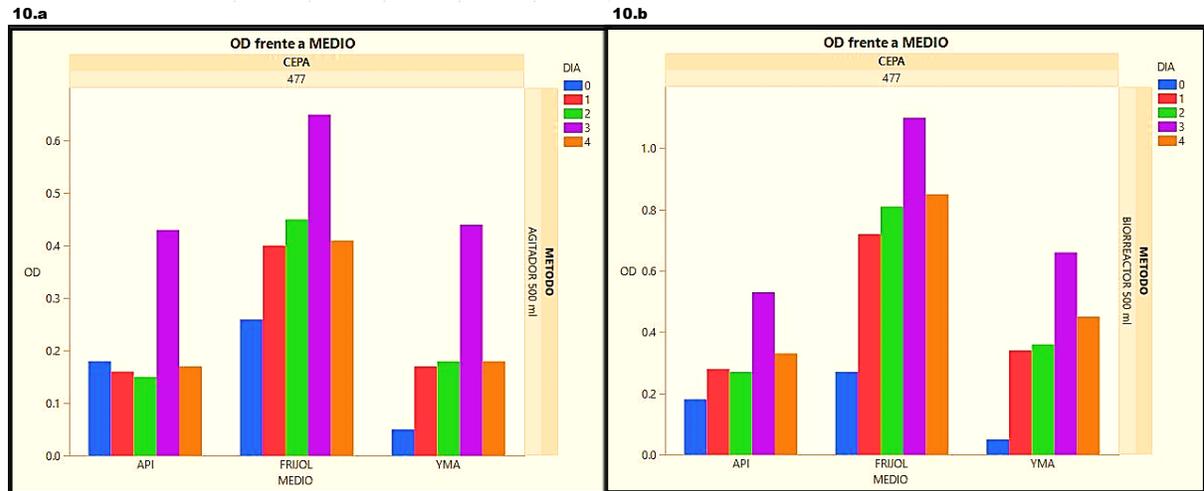
Significado de códigos: 0 '****' 0.001 '***' 0.01 '**' 0.05

Error: 0.05

En la tabla 8 de análisis de varianza (ANDEVA) con respecto a la variable oxido disuelto se observa que existe un valor significativo en las fuentes de variación día, concentración, medio y método con interacción en medio – método y concentración – cepa

En los siguientes gráficos se logrará apreciar detalladamente que día, concentración, medio y método son los que permiten las condiciones para obtener una mayor concentración de la bacteria.

Gráfico 10. Oxígeno disuelto de los medio API, FRIJOL y YMA de la cepa CR 477 para agitador y biorreactor.

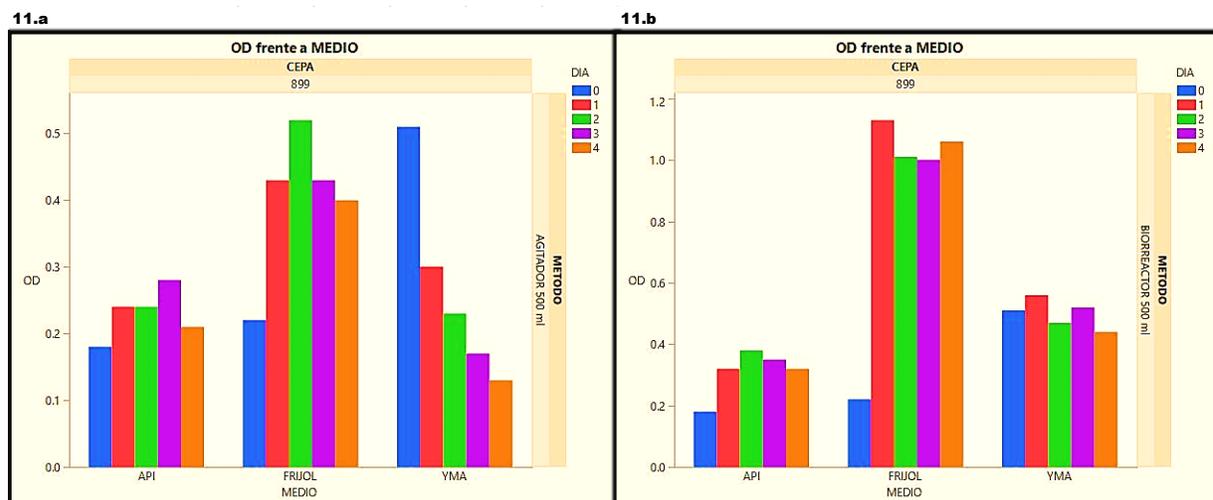


Fuente: Elaboración propia a partir del Software JMP

En el gráfico de barra 10.a se muestra que la cepa CR 477 multiplicada bajo el método agitador en los medios de cultivo API, FRIJOL y YMA presentó mayor crecimiento en el día 3, sin embargo, el mayor índice de crecimiento fue en el medio de cultivo FRIJOL. Paralelamente gráfico de barra 10.b se muestra el comportamiento de los medios líquidos API, FRIJOL y YMA inoculados con la cepa CR477 utilizando el método biorreactor, se observa que el medio de cultivo artesanal FRIJOL presenta mayor concentración de bacteria en el día 3 superando a los medio YMA y API

En ambos gráficos se logra observar que, con ambos métodos, el medio líquido Artesanal FRIJOL presenta mayor concentración, sin embargo, el método biorreactor presenta una tasa de crecimiento mayor, debido a que la bacteria responde mejor a la circulación de aire existente en el biorreactor.

Gráfico 11. Oxígeno disuelto de los medio API, FRIJOL y YMA de la cepa CIAT 899 para agitador y biorreactor.



Fuente: Elaboración propia a partir del Software JMP

En el gráfico de barra 11.a los resultados indican que el comportamiento de los medios líquidos API, FRIJOL y YMA para la variable oxígeno disuelto inoculados con la cepa CIAT 899 utilizando el método agitador, el medio de cultivo Artesanal FRIJOL presenta mayor concentración de bacteria en el día 3 superando a los medios YMA y API; Cabe mencionar que en el medio YMA se observa que la concentración de la bacteria disminuye a partir de la inoculación.

Así mismo en el gráfico 11.b muestra que los medios líquidos API, FRIJOL y YMA misma variable inoculados con la cepa CIAT 899 bajo el método biorreactor, el medio de cultivo Artesanal FRIJOL presenta mayor concentración de bacteria en el día 1 pero hay una pequeña disminución en el día 2 y 3 sin embargo en el día 4 hay un pequeño aumento, este comportamiento se da por características propias de la bacteria.

En los gráficos se logra observar que con ambos métodos el medio líquido Artesanal FRIJOL presenta mayor concentración, sin embargo, en el método biorreactor su concentración es mayor, debido a que la bacteria responde mejor a la circulación de aire existente en el biorreactor.

Tabla 9. Análisis de varianza para la variable conteo de colonias.

CONTEO DE UNIDADES FORMADORAS DE COLONIAS	
FUENTE DE VARIACION	P-VALOR
Día	2e-16***
Concentración - Medio	0.0145*
Concentración - Método - Cepa	0.0448**

Fuente: Elaboración propia apartir de los resultados obtenidos en el Software RBio

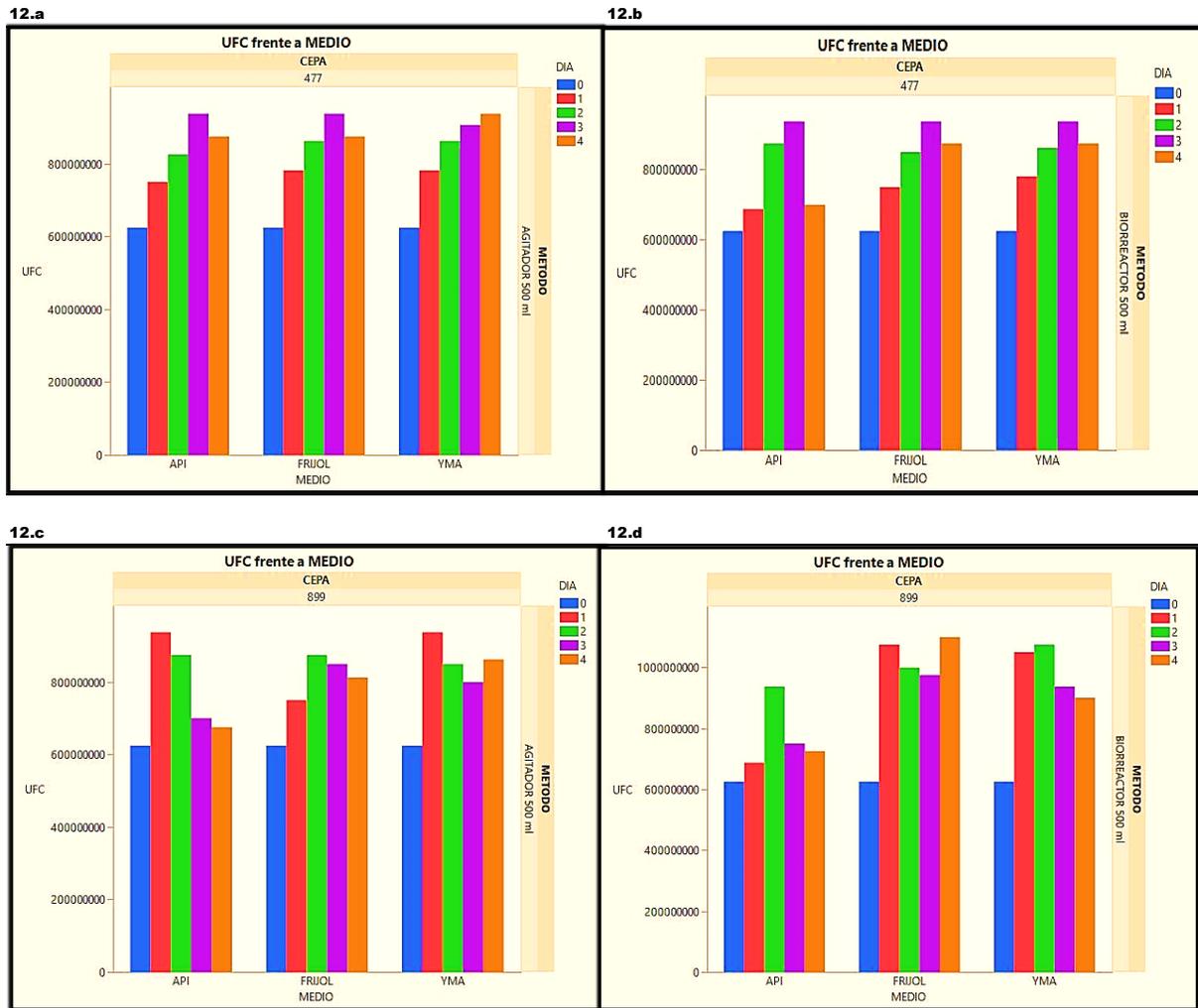
Significado de códigos: 0 '****' 0.001 '***' 0.01 '**' 0.05

Error: 0.05

En la tabla 9 de análisis de varianza (ANDEVA) con respecto a la variable unidades formadoras de colonias se observa que existe un valor significativo en las fuentes de variación día con interacción en concentración – medio y concentración – método – cepa.

En los siguientes gráficos se logrará apreciar detalladamente que día, permiten las condiciones para obtener una formación de colonias.

Gráfico 12. Unidades formadoras de colonias de los medios API, Frijol y YMA de las cepas CR477 y CIAT899 para agitador y biorreactor.



Fuente: Elaboración propia a partir del Software JMP

En el gráfico de barra 12.a demuestra que los medios líquidos inoculados con la cepa CR477 para la variable unidades formadoras de colonias con el método agitador presenta un mayor índice de crecimiento en el día 3 para los medios API y FRIJOL, sin embargo, para el medio YMA la mayor presencia de la bacteria se encuentra en el día 4. Paralelamente se observa el gráfico 12.b donde el comportamiento de la bacteria con el método biorreactor, la mayor concentración de la bacteria se encuentra en el día 3 para los tres medios de cultivo.

En el gráfico de barra 12.c Los resultados muestran que el comportamiento de la bacteria de *Rhizobium* por medio de la cepa CIAT 899 inoculada en los medios de cultivo líquido utilizando el método agitador presenta un crecimiento durante el día 1 (24 horas después de la inoculación) para los medios API y YMA, sin embargo, para el medio FRIJOL la mayor presencia de la bacteria se encuentra en el día 2, siendo API y YMA los medios con la mayor tasa de crecimiento.

El análisis también demuestra que el comportamiento de la bacteria con el método biorreactor (**grafico 12.d**) presenta una mayor concentración al tercer día de incubación en el medio líquido de API y YMA, sin embargo, para el medio de cultivo FRIJOL la mayor presencia de la bacteria se encuentra en el día 4.

IX. CONCLUSIONES

A partir de las evaluaciones realizada se Concluye que:

- El medio de cultivo líquido FRIJOL inoculado con la cepa CIAT 899 representa una alternativa local en cuanto a tiempo, dado que la multiplicación de la bacteria se obtiene al segundo día después de la inoculación.
- Para la conservación de la cepa en el sustrato sólido “Suelo” independientemente de los medios de cultivos líquidos la mejor cepa fue CR477.
- Como alternativa de producción artesanal para el pequeño productor se obtuvo que el método de biorreactor, sin importar el medio y la cepa presentó resultados satisfactorios.

Se observa que el medio líquido artesanal con mejor eficiencia fue FRIJOL, por lo que se cumple la hipótesis alternativa con respecto a la eficiencia de producción de nódulos de *Rhizobium* en el cultivo de frijol.

X. RECOMENDACIONES

Se recomienda que:

- Los medios líquidos YMA y API deben de pasar en proceso de agitación durante 4 días para obtener una adecuada concentración de la bacteria y para el medio FRIJOL por un período de 2 días.

- Utilizar cepas nativas, esto ayudará a una mejor aceptación de la bacteria en los suelos de la localidad a usar, de esta forma se obtendrá mejor calidad del cultivo.

- Utilizar fertilizantes o urea con dosificaciones menores, dado que la bacteria al ser fijadora de nitrógeno disminuye el uso de fertilizantes nitrogenados sin descartar su uso drásticamente.

- Combinar los sustratos LOMBRIHUMUS y SUELO, para evaluar el comportamiento de los sustratos combinados y obtener un producto final.

- Dejar el sustrato inoculado con la combinación de cepas y efectuar pruebas de calidad cada 15 días durante al menos 3 meses, para comprobar la viabilidad, reproducción y supervivencia de la bacteria.

XI. BIBLIOGRAFIA

- Aguilera, J. (2008). Obtenido de https://sct.uab.cat/estadistica/sites/sct.uab.cat.estadistica/files/Transp_JesusAguilera.pdf
- Alvarez, E. (2018). *Cultivo de frijol Phaseolus vulgaris*. Obtenido de http://www.centa.gob.sv/docs/guias/granos%20basicos/Guia%20Centa_Frijol%202019.pdf
- Arias, J., Jaramillo, M., & Rengifo, T. (2007). Manual Tecnico: Buenas Practicas Agricolas en la produccion de Frijol Voluble. *Manual Tecnico: Buenas Practicas Agricolas en la produccion de Frijol Voluble*.
- Avenza, A. (2018). *UF0019 Preparacion del medio de cultivo*. (Vol. 2).
- Ballesteros, M., & Lozano de Yunda, A. (s.f.). EVALUACIÓN DE LA FIJACIÓN DE NITROGENO POR CEPAS DE Rhizobium QUE NODULAN FRIJOL (Phaseolus Vulgaris L). REVISTA COLOBIANA DE QUIMICA, Volumen 23 N°2 . Obtenido de <https://revistas.unal.edu.co/index.php/rcolquim/article/view/16203/17080>
- BCN. (2019). *Plan de produccion consumo y comercio 2018/2019*.
- Bharti V., Mehta A. & Kumar A. 2015. Advances in the development of microbial biofertilizers as a tool for sustainable agriculture. Páginas 189-208. En: Nova Science Publishers (editores) Microbes in soil and their agricultural prospects. Dr. Harisingh Gour University (Central University), Sagar, MP, India.
- Bharti, V., Metha, A., & Kumar, A. (2015). Advances in the development of microbial biofertilizers as a tool for sustainable agriculture. India: Nova Science Publisher.
- Bhering, L. (2017). *Rbio: A tool for biometric and statistical analysis*.
- FAO. (2005). *Past trends and future project. Summary of a paper contributed by FAO to de 4th international food legumines research conference*.

- FAO. (2011). *Agronoticias: Actualidad agropecuaria de América Latina y el Caribe*.
- FAO. (2020). *El reto de tener un Sistema Nacional de Semillas funcional para el incremento de la productividad en la agricultura de Nicaragua*.
- Gallindo, E., Peña, C., & Serrano, L. (2007). "Aspectos de Ingeniería en fermentaciones: cómo mezclar gases, líquidos y sólidos". Obtenido de Descubrimientos y aportaciones científicas y humanísticas mexicanas en el siglo veinte, Academia Mexicana de Ciencias, : <https://docplayer.es/44663764-Domesticar-microorganismos-en-un-biorreactor-los-retos-del-bioingeniero.html>
- Granda, I. (2017). Inoculante a base de una cepa nativa de rhizobium leguminosarum bv. viciae col6 para la producción de phaseolus vulgaris l. loja ecuador.
- Hubbell, D. H. (2017). *Producción y uso de inoculantes*. Obtenido de Revista Ceiba , primer seminario centroamericano sobre fijación biológica de nitrógeno: <https://revistas.zamorano.edu/index.php/CEIBA/article/view/2>
- Ibarra, M. A. (2018). *EFFECTO DEL pH Y LA VELOCIDAD DE AGITACIÓN EN LA PRODUCCIÓN DE EXPOLISACARIDOS A PARTIR DE RHIZOBIUM LEGOMINOSARUM EN CULTIVO LIQUIDO*.
- INTA. (2014). Catálogo de semilla de granos básicos. *Variedades de arroz, frijol, maíz y sorgo liberadas por el INTA.*, P.15.
- Labrador, J., & Bonilla, R. (2014). *Infectividad y efectividad de rizobios aislados de suelos de la costa caribe colombiana en vigna unguiculata*. Obtenido de Revista colombiana de biotecnología.
- Maringá. (2013). *GENES - a software package for analysis in experimental statistics and quantitative genetics*. Obtenido de SciELO: https://www.scielo.br/scielo.php?pid=S180786212013000300001&script=sci_arttex

- Musquiz, M. (2005). *Positive impact of pulse consumption on human health*.
- Nadal, M. S., Moreno, Y. M. T., & Cubero, S. I. (2004). *Las leguminosas grano en la agricultura moderna*.
- La Rosa, J. 1982. INOCULE SUS LEGUMINOSAS CON BACTERIAS. Servicio de investigación agropecuarias. Boletín. Universidad Nacional de Cajamarca. Cajamarca, Perú.
- Pérez, R. (Enero de 2020). *Lifeder* . Obtenido de Lifeder : <https://www.lifeder.com/prueba-de-tukey/>
- Recinos, D. Y., & García, F. D. (2007). *Aislamiento, evaluación y selección de cepas simbióticas nativas de Rhizobium en Phaseolus Vulgaris L, en suelos agrícolas de El Salvador*.
- Rodriguez, E., Lorenzo , E., De Gracia, R., Gonzales, G., & Gonzales, F. (1997). *Manual Técnico para el Manejo Integrado del Cultivo de Frijol Común o Poroto (Phaseolus vulgaris L.) en el Sistema de Mínima Labranza* . Obtenido de Instituto de Invesigacion Agropecuaria de Panama.: <http://bdigital.binal.ac.pa/bdp/idiap/cultivofrijol1.pdf>
- Ruíz Argueso, T; Santa María, J; Labandera, C; Orive, R. 1979. CRECIMIENTO Y SOBREVIVENCIA DE RHIZOBIUM JAPONICUM CB 1809 Y RHIZOBIUM TRIFOLII WU 290 EN TURBAS ESPAÑOLAS DE DIFERENTES ORÍGENES. AN INIA/Aer.Prod.Veg. España
- Rusínque, M. (2010). *Desarrollo tecnológico de un biofertilizante con base en la bacteria diazotrófica Azotobacter chroococcum*. Obtenido de [https://repository.unimilitar.edu.co/bitstream/handle/10654/13760/Document o%20tesis%20maestria%20Mauricio%20Camelo.pdf?sequence=2&isAllowed=y](https://repository.unimilitar.edu.co/bitstream/handle/10654/13760/Document%20tesis%20maestria%20Mauricio%20Camelo.pdf?sequence=2&isAllowed=y).
- Statistic-solutions. (2013). ANOVA. Obtenido de <https://www.statisticssolutions.com/manova-analysis-anova/>
- Somasegaran, P., & Hoben, H. (1985). Handbook for Rhizobia. En *Methods in Legume - Rhizobium Technology*.

- Taiz, L., & Zeiger, E. (2006). *Fisiología Vegetal* (Vol. I). Castelló de la Plana: Universitat Jaume.
- TecnoStarts.net. (2016). *Diseños factoriales 2k sin réplicas*. Obtenido de TecnoStarts.net:
http://riotorto.users.sourceforge.net/R/doe_2ksin/index.html
- Urbina Salablanca , M. E., & Cáseres, N. J. (2004). *Efectos topológicos de maiz (Zea Mays L) y frijol (Phaseolus Vulgaris L) y la acción del inoculante, sobre el comportamiento de la maleza, crecimiento, desarrollo y rendimiento de los cultivos y el uso equivalente de la tierra .*
- Wang, T., Martínez, J., & López, I. (2001). Rhizobium y su destacada simbiosis con las plantas. *Microbiología en línea*. Obtenido de <http://www.biblioweb.tic.unam.mx/libros/microbios/Cap8/#:~:text=Rhizobium%20fue%20la%20primera%20bacteria,ocasionando%20graves%20problemas%20de%20contaminaci%C3%B3n>.

XII. ANEXOS

ANEXOS I. TABLAS DE ANALISIS DE VARIANZA

Tabla 10. *Análisis de varianza para la variable unidades formadoras de colonias en los medios de cultivo líquidos por día.*

UNIDADES FORMADORAS DE COLONIAS	
<i>FUENTE DE VARIACIÓN</i>	<i>P-VALOR</i>
Día	0.3851
Cepa	0.3818
Medio	0.0315*

Fuente: Elaboración propia apartir de los resultados obtenidos en el Software RBio

Tabla 11. *Análisis de varianza para la variable diámetro de la planta.*

VARIABLE DIAMETRO	
<i>FUENTE DE VARIACION</i>	<i>P-VALOR</i>
Cepa	0.251238
Medio	0.0
Tratamiento	1.0
Cepa - Medio - Tratamiento	1.0

Fuente: Elaboración propia apartir de los resultados obtenidos en el Software GENES

Tabla 12. *Análisis de varianza para la variable altura de la planta.*

VARIABLE ALTURA	
<i>FUENTE DE VARIACION</i>	<i>P-VALOR</i>
Cepa	0
Medio	0.006467
Tratamiento	0.154373
Cepa - Medio - Tratamiento	0.231416

Fuente: Elaboración propia apartir de los resultados obtenidos en el Software GENES

Tabla 13. *Análisis de varianza para la variable peso fresco de la planta.*

VARIABLE DEL PESO FRESCO DE LA PLANTA	
FUENTE DE VARIACION	P-VALOR
Cepa	0.024455
Medio	0.006209
Tratamiento	1.0
Cepa - Medio - Tratamiento	1.0

Fuente: Elaboración propia apartir de los resultados obtenidos en el Software GENES

Tabla 14. *Análisis de varianza para la variable peso seco de la planta.*

VARIABLE DEL PESO SECO DE LA PLANTA	
FUENTE DE VARIACION	P-VALOR
Cepa	0.019764
Medio	0.001466
Tratamiento	1.0
Cepa - Medio - Tratamiento	1.0

Fuente: Elaboración propia apartir de los resultados obtenidos en el Software GENES

Tabla 15. *Análisis de varianza para la variable peso seco de raíz de la planta.*

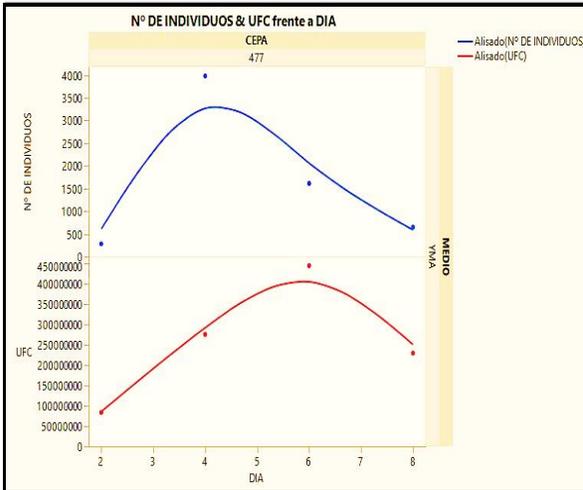
VARIABLE PESO SECO DE RAIZ	
FUENTE DE VARIACION	P-VALOR
Cepa	0.0002880
Medio	0.001601
Tratamiento	0.140373
Cepa - Medio - Tratamiento	0.33906

Fuente: Elaboración propia apartir de los resultados obtenidos en el Software GENES

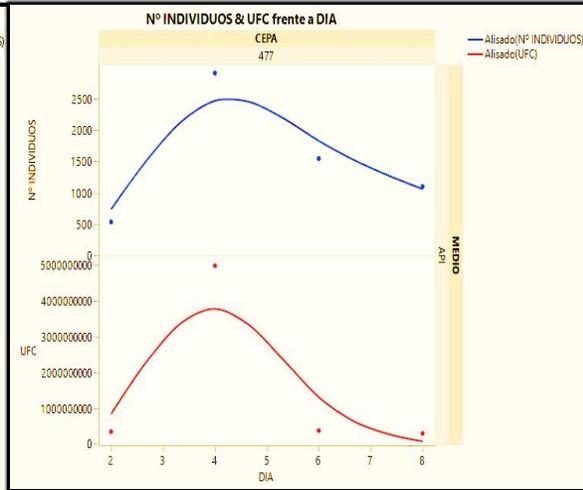
ANEXOS II. GRÁFICOS

Gráfico 13. Número de Individuos y Unidades Formadoras de Colonias del Medio YMA y API frente a día de la cepa CR 477.

13.a



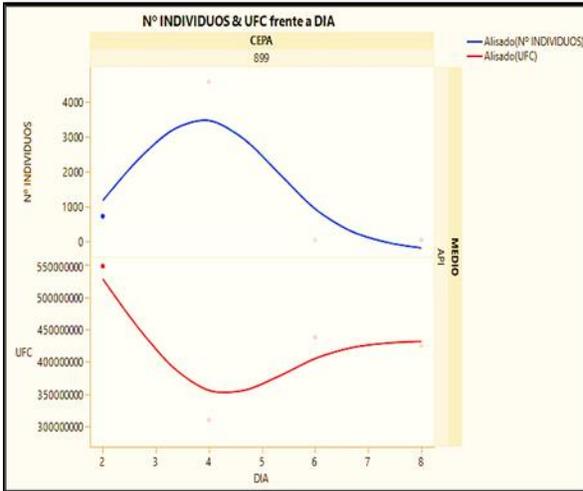
13.b



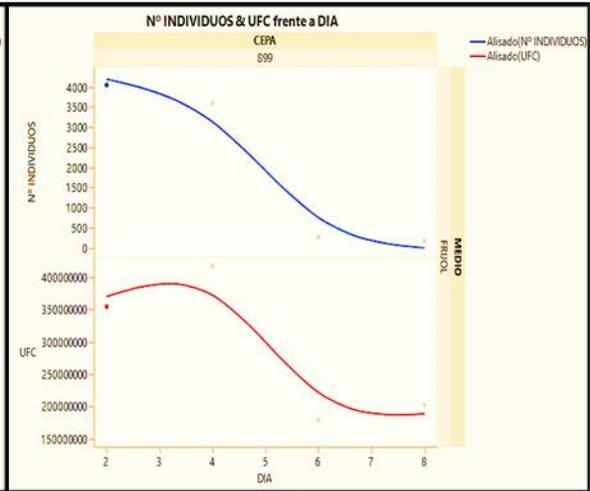
Fuente: Elaboración propia a partir del Software JMP

Gráfico 14. Número de Individuos y Unidades Formadoras de Colonias del Medio API, FRIJOL y YMA, frente a día de la cepa CIAT 899.

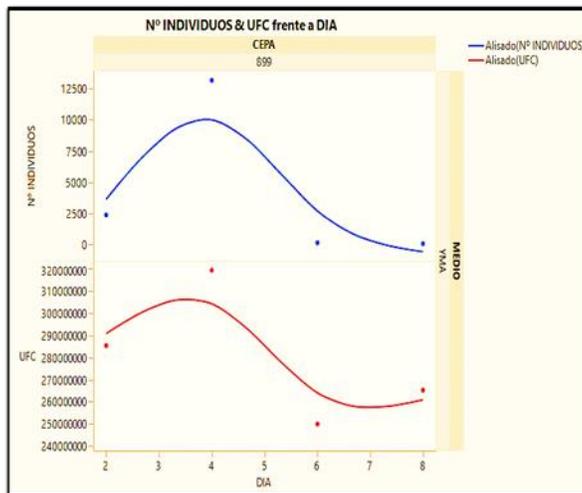
14.a



14.b



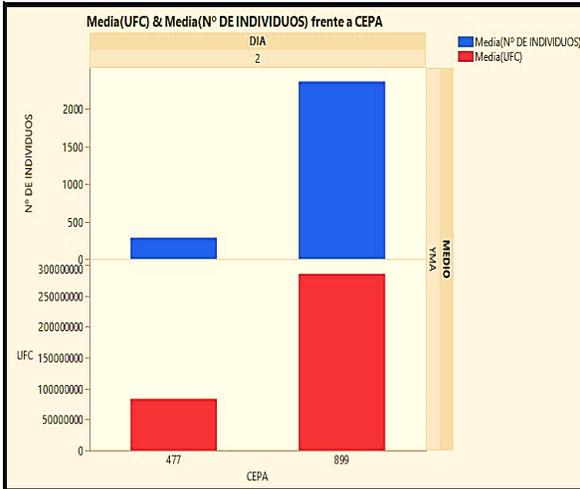
14.c



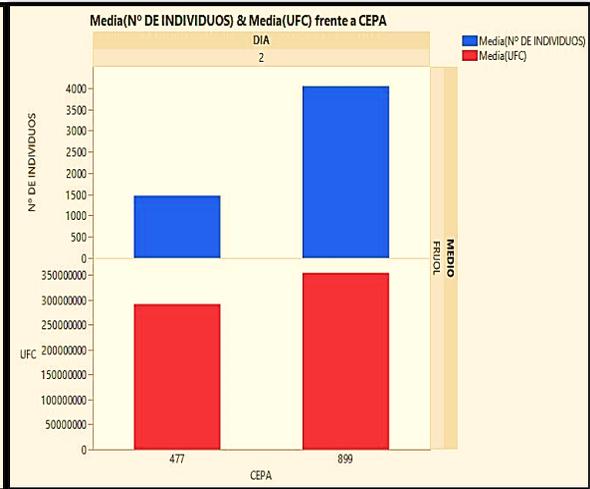
Fuente: Elaboración propia a partir del Software JMP

Gráfico 15. Número de Individuos y Unidades Formadoras de Colonias de los días 2 y 4, frente a las Cepas CR 477 y CIAT 899, del medio YMA. y “FRIJOL”

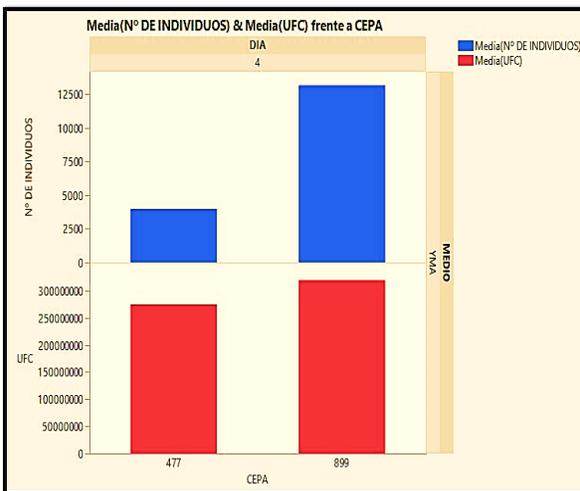
15.a



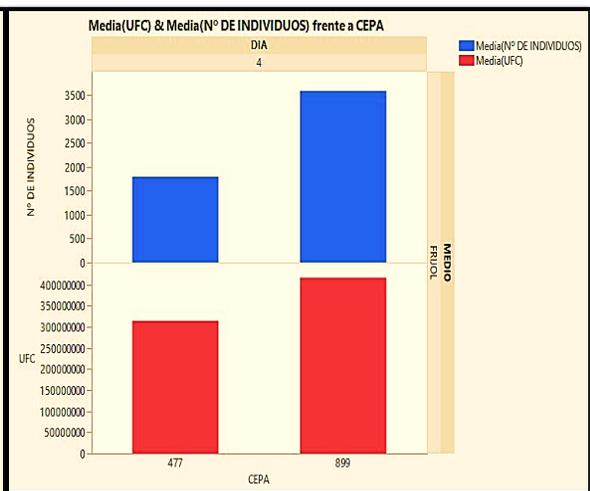
15.b



15.c

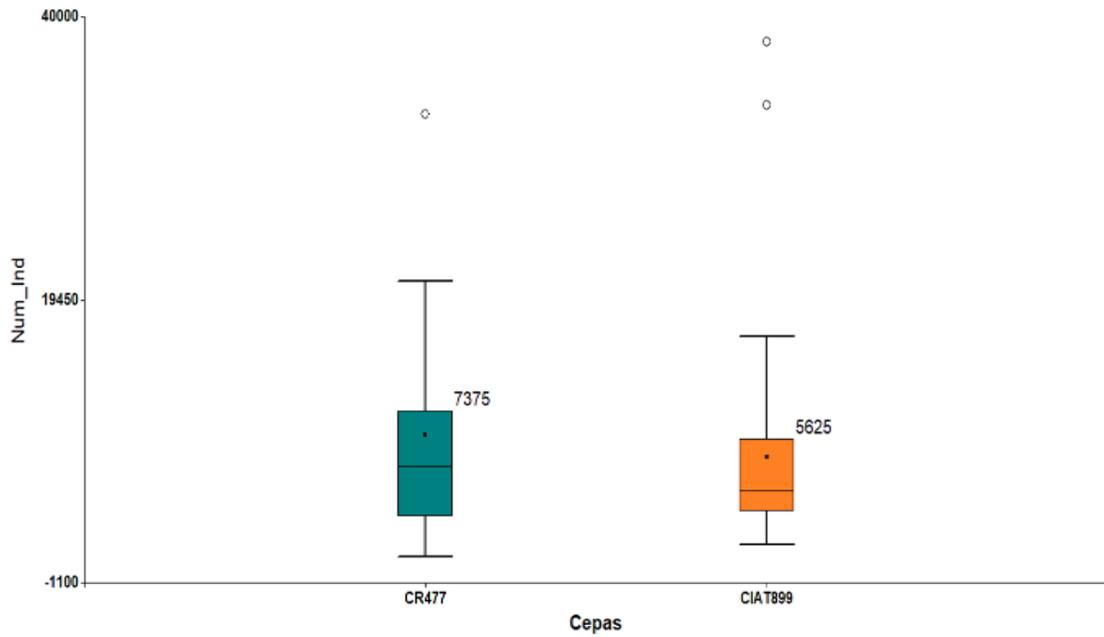


15.d



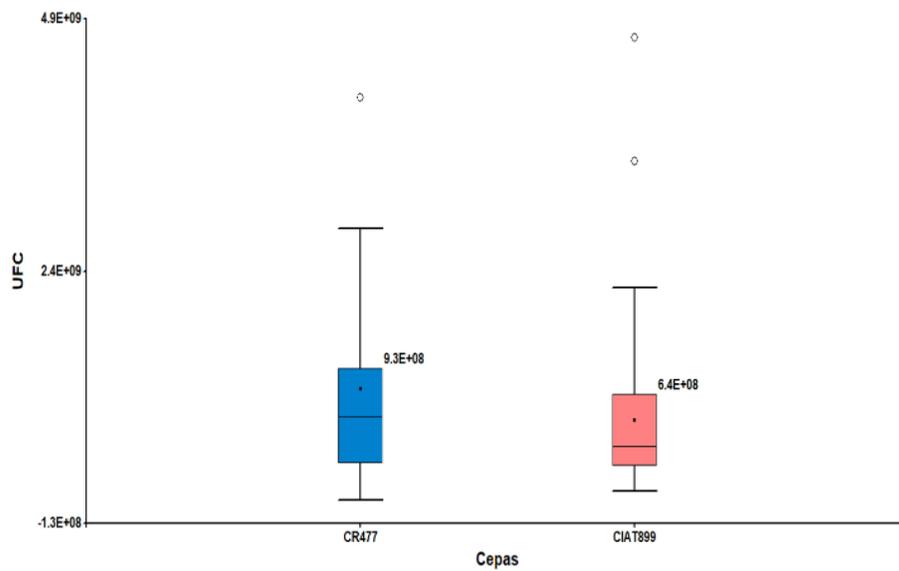
Fuente: Elaboración propia a partir del Software JMP

Gráfico 16. Test de Tukey para la variable conteo de individuo en las cepas CR 477 y CIAT 899.



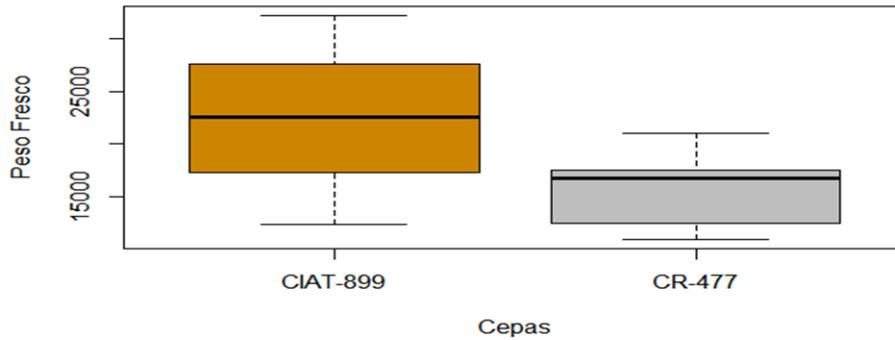
Fuente: Elaboración propia a partir del Software RBio

Gráfico 17. Test de Tukey para la variable Unidades Formadoras de Colonias cepas CR 477 y CIAT 899.



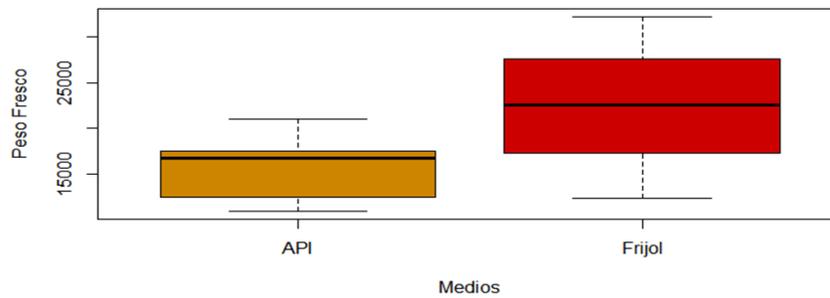
Fuente: Elaboración propia a partir del Software RBio

Gráfico 18. Test de Tukey para la variable peso fresco de la planta en las cepas CR 477 y CIAT 899.



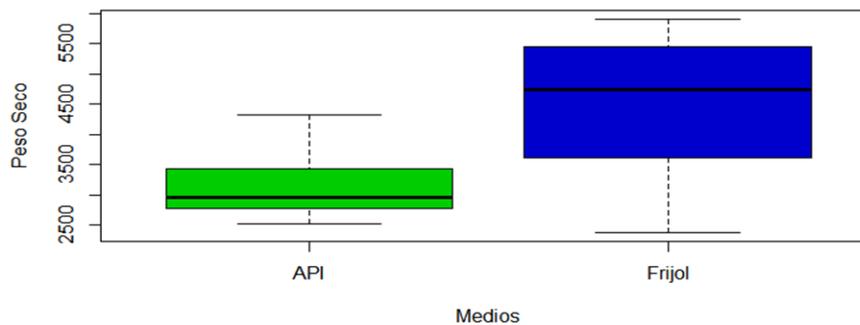
Fuente: Elaboración propia a partir del Software GENES

Gráfico 19. Test de Tukey para la variable peso fresco de la planta en los medios API y FRIJOL.



Fuente: Elaboración propia a partir del Software GENES

Gráfico 20. Test de Tukey para la variable peso seco de la planta en los medios API y FRIJOL.



Fuente: Elaboración propia a partir del Software GENES

Gráfico 21. Test de Tukey para la variable peso seco de raíz de la planta para las cepas CIAT 899 y CR 477.

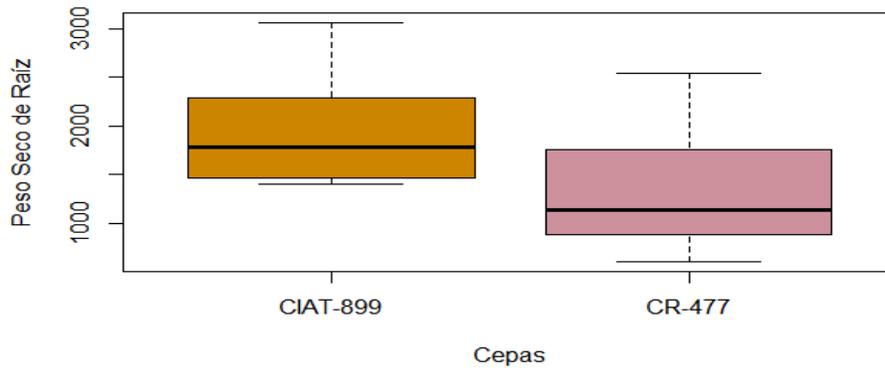
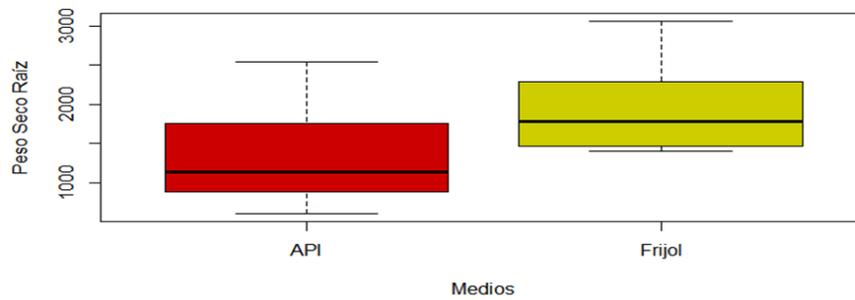


Gráfico 22. Test de Tukey para la variable peso seco de raíz de la planta en los medios API y FRIJOL.



Fuente: Elaboración propia a partir del Software GENES

ANEXOS III. PREPARACION DE MEDIOS ARTESANALES

Figura 6: Selección del grano de frijol para medio artesanal de FRIJOL.



Figura 5: Selección de material vegetal para medio de cultivo artesanal API.



Figura 7: Medios de cultivos líquidos artesanales, API (color amarillo) FRIJOL (color rojizo).



ANEXOS IV. PRUEBAS DE GOTAS Y CONTEOS DE INDIVIDUOS

Figura 8. Prueba de gota en plato Petri con rojo Congo dentro de cámara de flujo.



Figura 9. Bacteria Rhizobium en plato Petri con rojo Congo segmentado en partes iguales.

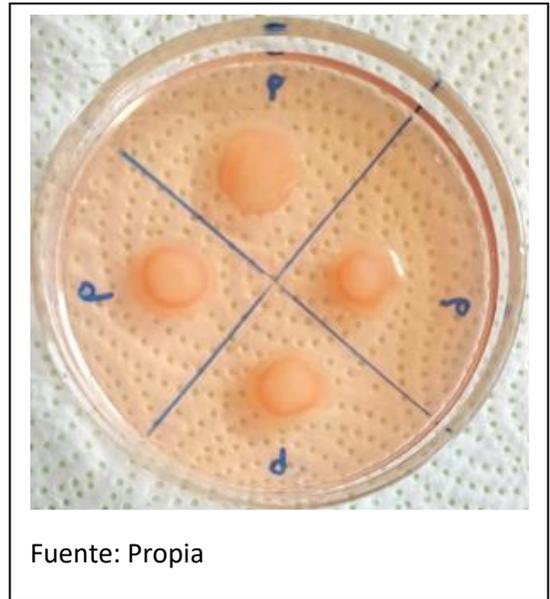


Figura 10. Tubos de ensayos con soluciones de medios de cultivos líquido artesanales listo para prueba de gota.



ANEXOS V. TOMA DE DATOS DEL CULTIVO DE FRIJOL

Figura 11. Nódulos de Rhizobium en raíz de la planta de frijol.



Figura 12. Medición del diámetro de tallo de la planta con vernier.



Figura 11. Extracción de raíces de macetera.



Figura 12: Peso de parte aérea de la planta.



Figura 13: Nódulos de rhizobium ya extraído de raíz.

