

EVALUACIÓN DE FIJACIÓN DE NITRÓGENO DE 3 ESPECIES DE LEGUMINOSAS  
INOCULADAS CON UN BIOFERTILIZANTE A BASE DE MICROORGANISMOS  
PRODUCIDO EN LA FINCA VIRAYÁ, MUNICIPIO DE VISTA HERMOSA, META



SERGIO ALEJANDRO MANJARRES CASTAÑEDA



UNIVERSIDAD SANTO TOMÁS  
FACULTAD DE INGENIERIA AMBIENTAL  
VILLAVICENCIO  
2022

EVALUACIÓN DE FIJACIÓN DE NITRÓGENO DE 3 ESPECIES DE LEGUMINOSAS  
INOCULADAS CON UN BIOFERTILIZANTE A BASE DE MICROORGANISMOS  
PRODUCIDO EN LA FINCA VIRAYÁ, MUNICIPIO DE VISTA HERMOSA, META

SERGIO ALEJANDRO MANJARRES CASTAÑEDA

Trabajo de grado presentado como requisito para optar al título de Ingeniero Ambiental

Asesor

ANGELA MARIA SASTOQUE SALCEDO

Microbióloga Industrial, MSc Manejo de Recursos Naturales Renovables y Medio Ambiente

UNIVERSIDAD SANTO TOMÁS  
FACULTAD DE INGENIERIA AMBIENTAL  
VILLAVICENCIO

2022

**Autoridades Académicas**

**P. JOSÉ GABRIEL MESA ANGULO, O. P.**

Rector General

**P. EDUARDO GONZÁLEZ GIL, O. P.**

Vicerrector Académico General

**P. JOSE ANTONIO BALAGUERA CEPEDA, O. P.**

Rector Sede Villavicencio

**P. RODRIGO GARCÍA JARA, O. P.**

Vicerrector Académico Sede Villavicencio

**Mg. JULIETH ANDREA SIERRA TABÓN**

Secretaria de División Sede Villavicencio

**WILLIAM PEÑARANDA ZÁRATE**

Decano de la Facultad de Ingeniería Ambiental

### **Dedicatoria**

Este logro va dedicado a mi madre Martha Lucero Castañeda, quien me ha acompañado en el transcurso de este proceso; a mi padre Hugo Manjarres, que con sus consejos se convirtió en un ejemplo de persona; a mis hermanos Lina Danixa Manjarres; Camila Andrea Manjarres; Hugo Fabián Manjarres, a los que les dedico de corazón este logro alcanzado, gracias por influir en mí al apoyarme y motivarme para seguir adelante. Por último y no menos importante a mis sobrinos Martín y Thomas López que desde su llegada me han llenado de alegría, bendiciones y muchas ganas de salir adelante, esto es dedicado a ustedes. Muchas gracias.

### **Agradecimientos**

Agradezco primeramente a Dios, por permitirme gozar de este logro, por protegerme, guiarme y que siempre sea su voluntad; a mis compañeras Laura Sánchez & Laura Becerra por su apoyo, paciencia como amigas y ahora orgullosamente en adelante como colegas; a mi directora Ángela María Sastoque por su compromiso, disponibilidad y por brindarme su conocimiento para culminar este proceso de formación; a el Ing. Agrónomo Jairo Aya quien me abrió las puertas de su empresa y confió en mi para la elaboración del trabajo y futuros proyectos; a la Universidad Santo Tomas, por brindar las bases necesarias y la formación vital para culminar mi carrera, como un profesional íntegro y preparado. Muchas gracias.

## Contenido

	Pág.
Resumen .....	10
Abstract.....	11
Introducción.....	12
1. Objetivos .....	15
1.1. Objetivo general .....	15
1.2. Objetivos específicos.....	15
2. Antecedentes .....	16
3. Marco de referencia.....	20
3.1. Marco teórico .....	20
3.2. Marco conceptual .....	21
3.3. Marco normativo .....	23
4. Metodología.....	25
4.1. Fase 1: descripción de la metodología establecida para la producción de biofertilizante. ....	25
4.2. Fase 2: análisis de las propiedades microbiológicas del biofertilizante.....	25
4.3. Fase 3: formación y proceso de nódulos como indicadores de su capacidad de fijación de nitrógeno. ....	28
5. Análisis y discusión de resultados.....	30
5.1. Descripción de la metodología establecida para la producción de biofertilizante .....	30
5.1.1 Descripción del entorno de producción de biofertilizante .....	30
5.1.2 Proceso de producción del biofertilizante.....	32
5.2. Análisis de las propiedades microbiológicas del biofertilizante .....	34

5.2.1	Selección de unidades formadoras de colonia para asilamiento .....	34
5.2.2	Análisis de resultados de la siembra de aislamiento en medio LMA .....	41
5.3.	Análisis de la inoculación del biofertilizante respecto a la capacidad de fijación de nitrógeno de las tres especies de leguminosas seleccionadas .....	43
5.3.1	Análisis de varianza y prueba de comparación de medias de Tukey.....	45
5.3.2	Prueba de procesamiento de nódulos producidos en las tres especies de leguminosas	48
6.	Impacto social y humanístico del proyecto .....	53
7.	Conclusiones .....	54
8.	Recomendaciones .....	56
9.	Referencias .....	57

**Lista de Tablas**

	Pág.
<b>Tabla 1</b> Normativa pertinente al proyecto de investigación .....	23
<b>Tabla 2</b> Parámetros fisicoquímicos del biofertilizante muestreado por cada tanque de producción .....	34
<b>Tabla 3</b> Descripción macroscópica de las unidades formadoras de colonia por siembra directa .	35
<b>Tabla 4</b> Descripción macroscópica de las unidades formadoras de colonia por siembra de dilución .....	36
<b>Tabla 5</b> Cajas de Petri seleccionadas para análisis macroscópico y pos-selección de pruebas bioquímicas de catalasa y oxidasa .....	37
<b>Tabla 6</b> Cajas de Petra con colonias seleccionadas para siembra de aislamiento en medio LMA	37
<b>Tabla 7</b> Descripción y selección de colonias destinadas para aislamiento en medio LMA.....	38
<b>Tabla 8</b> Análisis microbiológico bajo el método de tinción de Gram de la siembra de aislamiento en medio LMA.....	41
<b>Tabla 9</b> Descripción in situ de los nódulos generados por cada especie de leguminosa .....	44
<b>Tabla 10</b> Número de nódulos generados respecto la especie de leguminosa y la dosis de biofertilizante inoculado .....	44
<b>Tabla 11</b> Análisis de varianza de la producción de nódulos respecto a la concentración de biofertilizante y la especie de leguminosa .....	45
<b>Tabla 12</b> Análisis microbiológico bajo el método de tinción de Gram de la siembra del procesamiento de nódulos en medio LMA .....	50

## Lista de Figuras

	Pág.
<b>Figura 1</b> Diagrama ilustrativo de los antecedentes .....	19
<b>Figura 2</b> Siembra inicial de microorganismos presentes en el biofertilizante .....	27
<b>Figura 3</b> Diagrama ilustrativo del diseño experimental.....	29
<b>Figura 4</b> Mapa del área del desarrollo e influencia del proyecto.....	31
<b>Figura 5</b> Diagrama ilustrativo de la producción de biofertilizante llevada a cabo en finca Virayá adaptado de Zárate (2019). .....	33
<b>Figura 6</b> Desarrollo del diseño experimental respecto al diagrama planteado en la metodología	43
<b>Figura 7</b> Prueba de comparación de medias de Tukey para los tratamientos aplicados .....	46
<b>Figura 8</b> Prueba de comparación de medias de Tukey para las especies de leguminosas evaluadas .....	47
<b>Figura 9</b> Análisis macroscópico de la especie <i>Desmodium ovalifolium</i> .....	48
<b>Figura 10</b> Análisis macroscópica de la especie <i>Pueraria phaseoloides</i> .....	48
<b>Figura 11</b> Análisis macroscópico de la especie <i>Mucuna pruriens</i> .....	49

## Resumen

En la Orinoquia colombiana las particularidades geográficas y climáticas junto con las condiciones fisicoquímicas del suelo condicionan notoriamente el manejo de estos, debido a sus características de baja fertilidad química natural, su alta acidez, la baja actividad microbiológica derivada del tipo de arcilla, su poco material orgánico presente y los bajos contenidos de minerales alterables que junto con el uso inadecuado de fertilizantes nitrogenados condiciona aún más la disponibilidad de dicho nutriente dificultando el desarrollo de los cultivos y por ende obligando a extender la frontera agrícola en busca de nuevas tierras fértiles. Por ello, las técnicas establecidas para la fijación biológica del nitrógeno permiten incrementar el aporte nutricional del suelo destinado para la vegetación tanto natural como introducida mientras se contrarrestan los efectos medioambientales generados por el uso de fertilizantes químicos nitrogenados.

La presente investigación propuso la evaluación de un biofertilizante producido en finca Virayá municipio de Vista Hermosa, Meta medido por la capacidad de fijación de nitrógeno de tres especies de leguminosas. Para ello, se realizaron pruebas de laboratorio de caracterización morfológica, catalasa, oxidasa y tinción de Gram destinadas para la identificación y aislamiento de bacterias fijadoras de nitrógeno junto con el desarrollo de un diseño experimental de bloques al azar, permitiendo comparar la formación y coloración de los nódulos, como indicativo de la relación simbiótica entre microorganismos fijadores de nitrógeno y las raíces de las leguminosas. Demostrando la alta adaptabilidad y desarrollo de la especie de leguminosa *Mucuna pruriens*, así como la influencia que indica la aplicación en su máxima concentración del biofertilizante sobre el desarrollo nodular.

**Palabras Clave:** leguminosas, microorganismos, relación de simbiosis, fijación biológica de nitrógeno, biofertilizante.

### Abstract

In the Colombian Orinoquia the geographical and climatic particularities together with the physico-chemical conditions of the soil are notoriously conditioning the management of these, due to their characteristics of low natural chemical fertility, its high acidity, the low microbiological activity derived from the clay type, its little organic material present and the low content of alterable minerals that together with the inadequate use of nitrogenous fertilizers conditions even more the availability of said nutrient hindering the development of crops and therefore forcing to extend the agricultural frontier in search of new fertile lands. Therefore, the techniques established for the biological fixation of nitrogen allow to increase the nutritional contribution of the soil destined for both natural and introduced vegetation while counteracting the environmental effects generated by the use of fertilizers nitrogenous chemicals.

The present research proposed the evaluation of a biofertilizer produced in farm Virayá municipality of Vista Hermosa, Meta measured by the nitrogen fixation capacity of three species of legumes. For this purpose, laboratory tests of morphological characterization, catalase, oxidase and Gram stain were carried out for the identification and isolation of nitrogen-fixing bacteria together with the development of an experimental design of random blocks, allowing to compare the formation and coloration of nodules, as indicative of the symbiotic relationship between nitrogen-fixing microorganisms and legume roots. Demonstrating the high adaptability and development of the leguminous species *Mucuna pruriens*, as well as the influence that indicates the application in its maximum concentration of biofertilizer on nodular development.

**Key Word:** legumes, microorganisms, symbiotic relationship, biological nitrogen fixation, biofertilizer.

## Introducción

En el mundo, cerca de 1600 millones de hectáreas se emplean para el desarrollo de actividades agrícolas, ubicándose la mayoría en países de ingresos medios y bajos, los cuales, según las necesidades de la población proyectada para el año 2050 requieren de incrementar su producción agrícola en un 100%, esto deriva a la explotación intensiva de las actuales tierras cultivadas y la expansión de la frontera agrícola en el África Sahariana y América Latina (FAO, 2017). Las deficiencias nutricionales del suelo, principalmente del nitrógeno, junto con la elevada demanda del rendimiento de los cultivos, aumenta la necesidad de introducir agrícola e industrialmente tal elemento, y aunque con ello se ha conseguido elevar su producción también se le atribuyen escenarios de eutrofización, reducción de la biodiversidad vegetal de los ecosistemas y cambios en la actividad de los organismos fijadores del nitrógeno (Grant & Long, 2015) estableciendo a la agricultura convencional como una de las causas del deterioro de los suelos, al constituirse como un factor primordial en el proceso de degradación biológica (Pennock, 2016). En Colombia, el 38,6% de la superficie corresponde a suelo destinado para actividades agrícolas y pecuarias, siendo los departamentos de Caldas, Córdoba, Arauca y Casanare los de mayor relevancia (Departamento Administrativo Nacional de Estadística, 2014), sin embargo, aproximadamente el 71% del área cultivable está catalogada como área de utilización restringida ya que sus características la hacen propensa a procesos de degradación eventuales si el manejo de sus suelos no es de grado crítico (Instituto Geográfico Agustín Codazzi, 2014).

El municipio de Vista Hermosa, Meta destina el 19,5% de su área total (4084 km<sup>2</sup>) a la producción agrícola, pero, el manejo inadecuado de la tierras vinculadas a la presencia de monocultivos limpios, la escasa rotación de cultivos, el uso de agroquímicos, las malas prácticas de pastoreo, el bajo uso de leguminosas y la tala del bosque de galería, junto con las propiedades naturales de los suelos de la Orinoquia colombiana caracterizados por una baja fertilidad química, alta acidez y baja cantidad de materia orgánica mineralizable, reducen el aporte nutricional del nitrógeno, interviniendo en el desarrollo de la cobertura vegetal y con ello el rendimiento esperado de los cultivos. Dicha situación incrementa el empleo excesivo de fertilizantes químicos nitrogenados junto con las consecuencias ambientales que implican su uso, así mismo la pérdida

de la biodiversidad vegetal resulta inminente al requerir expandir la frontera agrícola con la finalidad de suplir su demanda (Instituto Geográfico Agustín Codazzi, 2014).

Por ende, la transición de técnicas de agricultura convencional a aquellas que implementan prácticas acordes a los principios de la agricultura ecológica o biológica, actualmente se presenta como una necesidad ligada a abarcar la diversidad de factores que comprometen el medio ambiente y la seguridad alimentaria, como lo es la creciente limitación de los recursos tierra y agua, la ineficiencia de los fertilizantes, los cuales en su proceso de fabricación e implementación modifican los ciclos biogeoquímicos incrementando la huella de carbono y contribuyendo a los cambios climáticos relacionados al efecto invernadero, la desaparición gradual de la capa de ozono y el atraso cultural junto con el deficiente manejo de la información por quienes tienen los mayores compromisos con la producción del suelo (Montes, Carmen & Ávila, William, 2013). Dentro de dichas técnicas requeridas, resalta aquellas destinadas a incentivar la fijación biológica del nitrógeno que corresponde al proceso de transformación del  $N_2$ , más conocido como nitrógeno atmosférico, en sus compuestos más reactivos y de mejor absorción para las plantas como son los nitratos, nitritos y el amoníaco. El desarrollo de estos procesos se lleva a cabo en un 90% bajo condiciones bióticas, principalmente por microorganismos, quienes además de encontrarse en la naturaleza representan mayor practicidad, reducción de costos e impactos ambientales que los inductores naturales abióticos (rayos UV) y los artificiales (equipos eléctricos e industriales) (Bellenger, Darnajoux, Zhang, & Kraepiel, 2020).

Finalmente, y al analizar la problemática del deficiente manejo y gestión del suelo en el municipio de Vista Hermosa, Meta, el cual por su ubicación geográfica solicita de un mayor requerimiento de fertilizantes en comparación a aquellos localizados en otras zonas del país y un tratamiento más agresivo de su preparación con el fin de roturar el suelo compactado por la explotación ganadera (Instituto Geográfico Agustín Codazzi, 2014) se establece que el estudio y empleo de metodologías para la fijación biológica del nitrógeno por medio de la introducción de cobertura de leguminosas en cultivos junto con el aporte nutricional de biofertilizantes permite reducir aquellas prácticas agrícolas que contribuyen a la degradación biológica del suelo y sus consecuencias. Lo que para el caso de las plantaciones del cultivo de palma africana (*Elaeis guineensis*) de la finca Virayá representa una oportunidad en la aplicación de tecnologías en base

a técnicas de la agricultura ecológica que permiten contrarrestar los efectos de dicha actividad sobre el suelo y reducir los impactos sobre los componentes bióticos como es la fauna y flora representativa del entorno natural del área de producción así como los abióticos indicados como los cuerpos hídricos y la calidad del aire de la zona.

## **1. Objetivos**

### **1.1. Objetivo general**

Evaluar la fijación de nitrógeno de tres especies de leguminosas inoculadas con un biofertilizante a base de microorganismos autóctonos del suelo producido en finca Virayá del municipio de Vista Hermosa, Meta.

### **1.2. Objetivos específicos**

Identificar el proceso llevado a cabo en finca Virayá para la producción de biofertilizante en relación con el entorno natural en el que se desarrolla.

Caracterizar microbiológicamente el biofertilizante con la finalidad de establecer la presencia de microorganismos específicos con capacidad potencial de fijación de nitrógeno.

Establecer cuál especie de leguminosa indica mejor afinidad a la inoculación de biofertilizante por medio de pruebas de procesamiento de nódulos como indicadores de su capacidad de fijación de nitrógeno.

## 2. Antecedentes

Hodson & Díaz (2013) recopilan estudios desarrollados en el laboratorio de Asociaciones Suelo – Planta – Microorganismo de La Unidad de Biotecnología Vegetal de la Pontificia Universidad Javeriana sobre las bacterias promotoras del crecimiento de las plantas, el ciclaje de nutrientes y la supresión de agentes fitopatógenos con el objetivo de caracterizar e identificar microorganismos que tengan el potencial de ser formulados como bioinoculantes y/o biofertilizantes. Dentro de sus hallazgos identifican el papel en la fijación biológica del nitrógeno por parte de las cepas *Azospirillum*, *Pseudomonas*, *Azotobacter* y *Bacillus* mediante la técnica denominada *Metodología Efectiva de Evaluación, Selección y Tamizaje para la Identificación de Microorganismos más Promisorios con Actividad Biológica Demostrada*, la cual consiste en la caracterización inicial de los microorganismos de la rizosfera y del interior de la planta en cuestión en la zona de estudio, el aislamiento y caracterización de los microorganismos promotores del crecimiento vegetal, el desarrollo de ensayos de inoculación de las cepas en las plantas de interés (estudio de la interacción planta - microorganismo) y evaluación de su potencial para favorecer el crecimiento vegetal y las formaciones nodulares, la selección de las cepas más promisorias así como la evaluación de la inoculación de plantas de interés junto con el estudio de la respuesta y el finalmente el desarrollo a mayor escala del bioinoculante. De igual manera, resaltan la importancia de formular estudios sólidos adaptados a cada región y sus condiciones, ya que facilitan el aprovechamiento de las múltiples ventajas de emplear biofertilizantes en la producción vegetal siempre y cuando estén formulados bajo el análisis de las cepas microbianas, la concentración mínima de microorganismos viables en el insumo y la validación de la actividad biológica para la cual el producto es recomendado.

Así mismo, los métodos de la agricultura sostenible permiten emplear técnicas de producción de menor impacto al incorporar el uso de abonos orgánicos, biopesticidas y biofertilizantes, los cuales se componen de microorganismos aptos para la mejora del suelo, el tratamiento de agua y el manejo de residuos agropecuarios (Altieri, 2015). En la finca agroecológica de Zamorano, Honduras se emplean biofertilizantes producidos a base de microorganismos de montaña (MM), los cuales aún no se encontraban caracterizados microbiológicamente generando incertidumbre por sus posibles propiedades, por ende, mediante

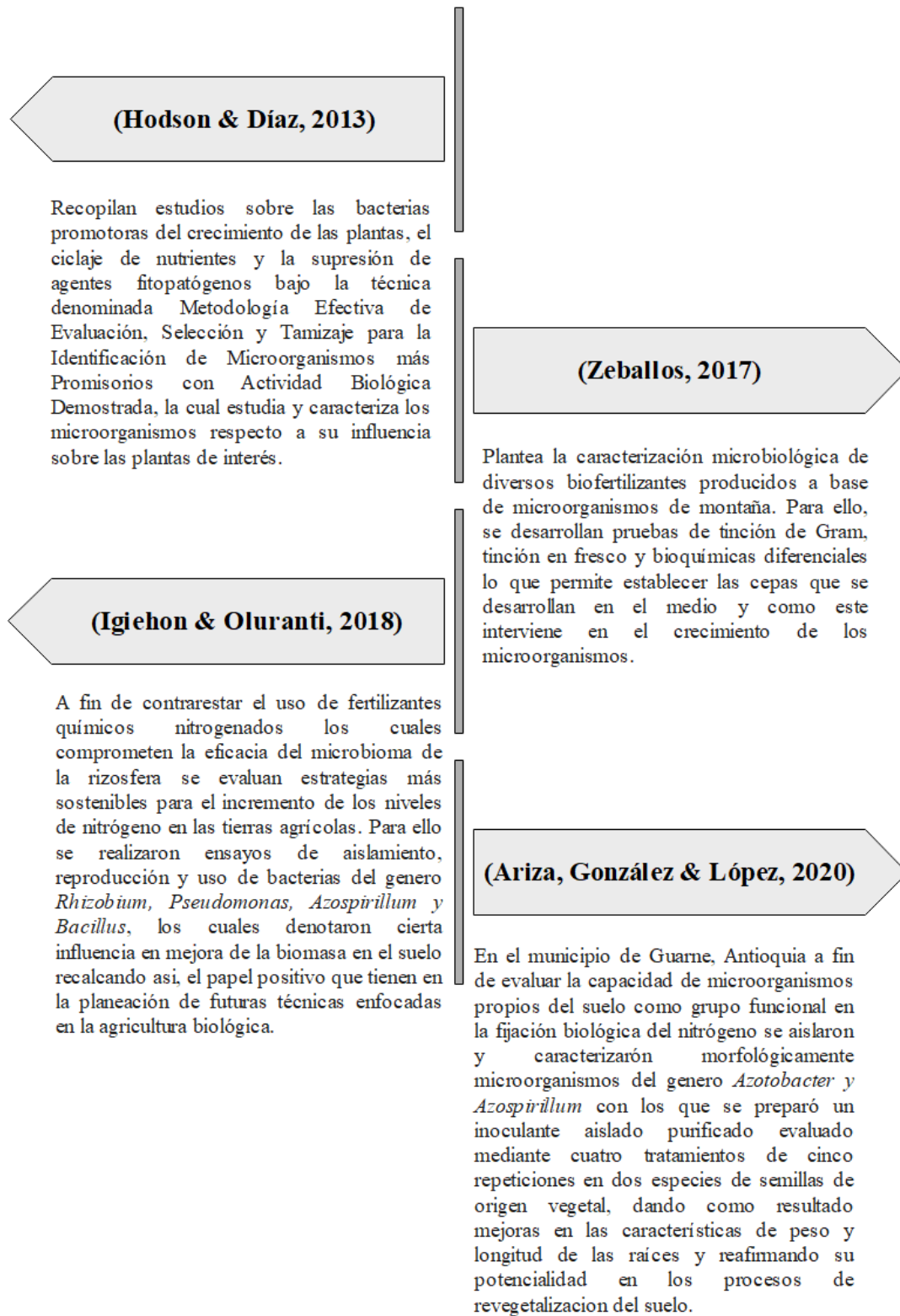
pruebas realizadas en el laboratorio de microbiología como son el método de tinción de Gram, tinción en fresco y algunas pruebas bioquímicas diferenciales, se logra identificar al menos siete cepas de microorganismos conformados por cuatro de bacterias del género *Micrococcus sp*, *Streptococcus sp*, *Bacillus* y *Lactobacillus*, dos de levaduras del género *Saccharomyces sp* y *Candida sp* y una de hongo del cual no se logró establecer su género y/o especie. Los resultados concluyen que algunos compuestos de los biofertilizantes intervienen en el medio de crecimiento de los microorganismos y así mismo modifica las propiedades técnicas de estos (Zeballos, 2017).

Por otra parte, se establece que la comunidad microbiana de la rizosfera, incide en la mejora del crecimiento y rendimiento de las plantas, pero al estar fuertemente influenciados por los factores ambientales como el tipo de suelo, la presencia de cultivos, el cambio climático y el desarrollo de las actividades antropogénicas su eficiencia se ve reducida. Dentro de estas actividades el uso reiterado de fertilizantes químicos a base de nitrógeno se encuentra asociado con la degradación del entorno natural, por lo que resulta necesario emplear estrategias más sostenibles para incrementar los niveles de nitrógeno en las tierras agrícolas. Esto se realiza mediante el aprovechamiento de las rizobacterias endófitas y de vida libre que fijan el nitrógeno; dichas bacterias corresponden al género *Rhizobium*, *Pseudomonas*, *Azospirillum* y *Bacillus*, y por medio de ensayos elaborados en la Universidad de North Westh en Mmabatho, Sudáfrica respecto a pruebas de aislamientos, reproducción y empleo, demostraron impactos positivos en la mejora de la biomasa de los cultivos tanto en la superficie como en los horizontes inferiores del suelo, por lo que resaltan la importancia que tienen al poder desarrollar un papel positivo en la planeación de técnicas enfocadas en la agricultura biológica (Igiehon & Oluranti, 2018)

Finalmente, Ariza, González & López (2020), indican que los problemas de degradación de los suelos causan que en la actualidad los fijadores biológicos de nitrógeno libre (FBNL), presenten potencial como microorganismos regeneradores de dicho recurso. Por ende, en el municipio de Guarne, Antioquia, y con el objetivo de evaluar la capacidad de dichos microorganismos propios del suelo de la región como grupo funcional, se aislaron colonias de muestras de crecimiento inicial en medios selectivos Ashby y medio selectivo para Fijadores Biológicos de Nitrógeno (FBN Sobiotech), en un tiempo de incubación de 24 a 48 horas a una temperatura de 34 °C, para posteriormente caracterizarlos morfológicamente y bajo condiciones

de forma, borde, elevación, superficie, consistencia, aspecto, color y tamaño establecer similitudes con microorganismos del género *Azotobacter* y *Azospirillum*. De igual manera, y considerando las características fisicoquímicas del suelo, categorizado como degradado, se inocularon dos tipos de semillas de las especies vegetales *Zea mays* y *Brachiaria decumbens* con un preparado de aislado purificado; dichas semillas fueron sembradas y sometidas a cuatro tratamientos con cinco repeticiones durante 36 días en invernadero, dando como resultado cierta incidencia del bioinoculante en el incremento del peso seco y longitud de raíces de las semillas *Brachiaria decumbens*, reafirmando su potencialidad para la mejora de los procesos de revegetalización en suelos intervenidos.

**Figura 1** Diagrama ilustrativo de los antecedentes



### 3. Marco de referencia

#### 3.1. Marco teórico

Los agroecosistemas se caracterizan según su nivel de artificialización, lo que permite establecer si requieren fuentes auxiliares de energía, ya sea humana, animal o combustible para el aumento de la producción, su grado de diversidad, que normalmente suele ser reducido y establece si corresponde a monocultivos o no, la predominancia de animales y plantas la cual en métodos agrícolas convencionales son seleccionados artificialmente, los controles del sistema que en su mayoría son externos y mediante la acción del hombre, y finalmente su grado de reinversión de materia orgánica (Altieri, 2015). Una práctica común en los agroecosistemas de monocultivo es la fertilización química nitrogenada, la cual, aunque compensa en términos de producción las deficiencias nutricionales del suelo, su aplicación excesiva resulta eventualmente en la degradación de la calidad del suelo, su acidificación y lixiviación de N a fuentes hídricas y la contaminación atmosférica al incrementar las emisiones de óxido nitroso ( $N_2O$ ), descrito como un potente gas de efecto invernadero (Sainju, Ghimire, & Pradhan, 2019). Por ende, se puede afirmar que un agroecosistema creado por el hombre comúnmente presenta un equilibrio inestable el cual implica el aumento en las plagas y enfermedades, la pérdida de la fertilidad de los suelos, erosión y uniformidad genética implicando sobrecostos económicos y ambientales al tratar de compensar los desequilibrios (Rodríguez, 2018).

Como respuesta a dicho desequilibrio el enfoque agroecológico ha adquirido una gran relevancia en los últimos años, ya que considera los ecosistemas agrícolas como las unidades de estudio fundamentales, en donde los ciclos biogeoquímicos, el control de plagas y enfermedades, los procesos biológicos, el manejo y gestión del suelo, las relaciones sociales y económicas son analizadas como un todo. En la agroecología, la cual está conformada por diferentes ramas como la agricultura orgánica, biodinámica y agrobiológica, el interés principal no es maximizar la producción de un solo componente, como los cultivos, si no optimizar los sistemas agrícolas en general. Las bases agroecológicas para el diseño y manejo de sistemas agrícolas sustentables buscan lograr un equilibrio de manejo dinámico entre los factores ambiental y las practicas agrícola, aquellas que se resaltan por su sustentabilidad son las enfocadas al manejo de la cobertura

vegetal y la fertilidad del suelo, a los mecanismos de reciclado de nutrientes y de control de poblaciones de plagas (Rodríguez, 2018). Una de las metodologías planteadas para el manejo de la cobertura vegetal y la fertilidad del suelo consiste en el empleo y producción de biofertilizantes, los cuales al contener células vivas de cepas seleccionadas para el aporte de la fijación biológica del nitrógeno representan un contraste significativo con los fertilizantes químicos, tanto en su costo y capacidad de renovación como en la incidencia sobre los aspectos ambientales del entorno (Jupinder, 2022).

### 3.2. Marco conceptual

*La agroecología* es el intento de aplicar principios ecológicos a los sistemas agrícolas, con el objetivo de mantener esos sistemas de manera ambientalmente racional; según Chesworth (2008) la define como una ciencia global o integradora que define, clasifica y estudia los sistemas agrícolas desde una visión agronómica, ecológica y socioeconómica, estudiando las relaciones entre los organismos vivos y su ambiente. Dentro de esta ciencia surgen diversas ramas como lo es la agricultura orgánica la cual es un sistema de producción que evita o excluye el uso de fertilizantes químicos, herbicidas, fungicidas, insecticidas, reguladores del crecimiento y todo tipo de compuestos sintéticos. Basándose en la rotación de los cultivos, en la utilización de estiércoles de animales, leguminosas, abonos verdes, empleo de sustancias minerales, control biológico de plagas y enfermedades (Rodríguez, 2018). Así mismo, una de las bases fundamentales de la agroecología es el *agroecosistema* descrito como un ecosistema que ha sido modificado por la práctica de la agricultura (Chesworth, 2008).

Por otra parte, uno de los nutrientes esenciales para el desarrollo y crecimiento de las plantas, independientemente de si corresponde a vegetación natural o introducida es el *nitrógeno*. Al ser el principal contribuyente de los aminoácidos de las plantas que generan proteínas y ácidos nucleicos, además de formar parte de vitaminas, fosfolípidos y clorofila. Su principal función es aumentar el vigor de las plantas de los cultivos, dar el color verde a las hojas y a la planta en general, promover la formación de yemas y por tanto es el elemento que promueve la formación de tejido vegetal potencializando el crecimiento de la planta. En la planta su deficiencia conduce a un bajo crecimiento, color verde pálido, escaso macollamiento y por ende conlleva a una mala

calidad. Sin embargo, los excesos de nitrógeno en la planta determinan un excesivo crecimiento de la planta, volcamiento y toxicidad. Los cultivos no tienen una absorción preferencial de una forma definida de N en la solución del suelo. El nitrógeno (N) es absorbido por las plantas principalmente en forma de  $\text{NO}_3^-$  (nitrato). Aunque algunos autores aseguran que los iones nitrato ( $\text{NO}_3^-$ ) y amonio ( $\text{NH}_4^+$ ) son por el cultivo desde un punto de vista agronómico, de todos modos, los fertilizantes nitrogenados que no estén en forma de nitratos son transformados a esta forma en el suelo, la cual es altamente soluble en agua (Estrada, 2002).

La asimilación del nitrógeno por parte de la planta se lleva a cabo mediante la ***Fijación biología del nitrógeno (FBN)***, en donde el desarrollo de las metodologías que la incentiven constituye una alternativa al uso de fertilizantes nitrogenados debido a que los procesos de nitrificación se llevan a cabo por relaciones simbióticas entre microorganismos asociados a las raíces de leguminosas (Fernandez Pascual, 2005). Usualmente, la aplicación de microorganismo al suelo se da por medio de inoculantes o biofertilizantes, descritos como insumos elaborados a partir de la fauna autóctona del suelo (Grageda-Cabrera, Díaz-Franco, Peña-Cabriales, & Vera-Nuñez, 2012). De igual manera, La función de la ***fijación simbiótica de nitrógeno por las leguminosas*** se puede resumir como la habilidad para fijar nitrógeno del aire otorgándole la capacidad de competir cuando se encuentra asociada con otros cultivos mientras aportan nitrógeno disponible a las no leguminosas (Mateusz, Agata, & Magdalena, 2020). Dicho proceso parte de la simbiosis mutualista de los microorganismos con las raíces de las plantas al colonizarlos en busca de compuestos carbonatados mientras benefician el desarrollo y nutrición de la planta al aportarle nutrientes minerales. Esta relación llega hasta el grado en que existe obligatoriedad e interdependencia; por lo que, aunque puedan vivir separados, determinadas actividades fisiológicas solo se llevan a cabo en simbiosis (Hodson & Zamudio, 2013).

Por lo cual, el mayor indicativo de la relación de simbiosis mutualista corresponde a la formación de ***nódulos*** en las raíces de las leguminosas. Previo a su aparición, las bacterias modulantes presentes en el suelo cercano a la raíz se estimulan debido a la secreción de nutrientes y factores de crecimiento producido por la raíz. Los pelos radiculares son entonces infectados en zonas separadas una de otras a lo largo de la raíz; el número de pelos infectados depende de la especie. Esta variación está determinada por la capacidad genética del huésped para desarrollar

raíces secundarias. Los pelos infectados pueden ser reconocidos al microscopio por que forman una especie de tubo que contiene las bacterias fijadoras de nitrógeno, éstas a su vez estimulan algunas células tetraploides de la corteza que se vuelven meristemáticas y forman el nódulo, estimuladas por la infección. Cuando los nódulos son de gran tamaño, su número es escaso, cuando son pequeños generalmente son abundantes. La vida de los nódulos en especies herbáceas es generalmente corta. El tiempo transcurrido para la aparición del primer nódulo varía con la especie de leguminosa. El trébol aparece a los 11 días después de la siembra, en alfalfa 23 días y en especies tropicales se presenta entre los 17 y 26 días. La cantidad de nitrógeno fijado por la leguminosa depende de la especie hospedera que vive asociada con ella. La presencia de *leghemoglobina* en los nódulos es necesaria la fijación de nitrógeno. Los nódulos formados se describen como no efectivos al ser de color blanco en su interior y no contienen leghemoglobina. El pigmento rojizo de los nódulos efectivos gradualmente cambia a verde a medida que el tejido envejece y cesa la fijación de nitrógeno. Finalmente se considera que las interacciones microbianas expresadas por fenómenos de competencia o sinergismos en la rizosfera son fundamentales para determinar la viabilidad y eficacia de la introducción en el suelo de microorganismos aplicados en forma de biofertilizantes o como agentes de control biológico (Kamini *et al.*, 2021).

### 3.3. Marco normativo

El marco normativo corresponde a la legislación actual relevante para el desarrollo del proyecto ya que fundamenta y contextualiza su importancia desde el componente legal.

**Tabla 1** Normativa pertinente al proyecto de investigación

Norma	Aplicabilidad
<b>Constitución Política de Colombia (1991) - Art 64,65,66 79 y 80</b>	Determina que el estado es el encargado de proteger, conservar y gestión la diversidad e integridad del ambiente, así como de fomentar la educación entorno a esto.
<b>Ley 99 de 1993</b>	Establece a las Corporaciones Autónomas Regionales (CAR'S) como las encargadas de la gestión, conservación, uso y

Tabla 1. Continuación

	aprovechamiento del medio ambiente y los recursos renovables, a fin de asegurar un desarrollo sostenible
<b>Resolución 187 de 2006 – Art 22</b>	Dicha resolución establece la adopción e implementación del “Reglamento para la producción primaria, procesamiento, empaçado, etiquetado, almacenamiento, certificación, importación, comercialización de Productos Agropecuarios Ecológicos”, así mismo, en el artículo 22, determina las funciones del Sistema de Control para la Producción Ecológica, coordinado por la Dirección de Desarrollo Tecnológico del MADR.
<b>Resolución 199 de 2016</b>	Por el cual se modifica parcialmente el “Reglamento para la producción primaria, procesamiento, empaçado, etiquetado, almacenamiento, certificación, importación, comercialización de Productos Agropecuarios Ecológicos” adaptado de la Resolución 187 de 2006.
<b>Ley 101 de 1993</b>	Ley general del desarrollo agropecuario y pesquero, establece los propósitos para proteger el desarrollo de las actividades agropecuarias y pesqueras con enfoque sostenible.
<b>Decreto No. 1840 del 1994</b>	Se concede al Instituto Colombiano Agropecuario ICA coordinar las campañas de control, prevención y erradicación de plagas y enfermedades, además del manejo de la sanidad ambiental, vegetal y el control técnico de los insumos agropecuarios por medio de la epidemiología.
<b>Resolución 375 de 2004</b>	Dictamina las disposiciones sobre el Registro, Control de Bioinsumos y Extractos Vegetales de uso agrícola en Colombia. Allí se indican los protocolos de ensayo de eficacia para el registro o ampliación de bioinsumos, otorgado por el Instituto Agropecuario Colombiano.

## 4. Metodología

El desarrollo del proyecto comprende la obtención de biofertilizante llevado a cabo en la finca Virayá en el municipio de Vista Hermosa departamento del Meta, localizada en las coordenadas 3°8'27.37" N y 73°42'2.50" O, así mismo la selección de las especies de leguminosas se realizó en base a la flora representativa de dicho entorno, con el objetivo de establecer los principios microbiológicos de la relación planta - biofertilizante en el área de producción. Los estudios enfocados en el análisis de las metodologías para la fijación biológica del nitrógeno resultan de gran relevancia para el desarrollo agrícola de la región de la Orinoquia, al ofrecer métodos sostenibles para el aporte nutricional de los cultivos, en donde las propiedades naturales del suelo se logran conservar e incluso incrementar, sin comprometer el equilibrio ecosistémico de la zona.

### 4.1. Fase 1: descripción de la metodología establecida para la producción de biofertilizante.

La primera fase del proyecto describe el método de producción del biofertilizante aplicado en finca Virayá, al emplear como materia prima elementos propios del área de estudio, se establecen las siguientes actividades a fin de complementar la información sobre el proceso:

1. La visita de campo inicial se destinó para la descripción del entorno del proyecto bajo información primaria y la búsqueda bibliográfica de los factores bióticos y abióticos implicados.
2. Identificar el proceso de producción de biofertilizante empleado en la finca Virayá, en relación con los materiales y métodos requeridos para su elaboración.

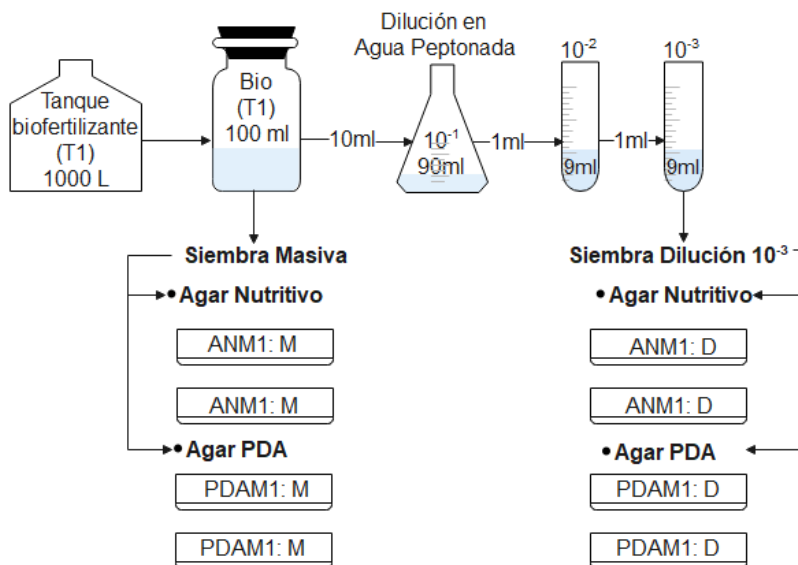
### 4.2. Fase 2: análisis de las propiedades microbiológicas del biofertilizante

A continuación, se describe los procesos requeridos para llevar a cabo el análisis de las propiedades microbiológicas del biofertilizante:

4.2.1. Toma de muestra del biofertilizante producido en la finca Virayá en el municipio de Vista Hermosa, Meta: al momento de la muestra se encontraban seis (6) tanques de producción activos, por cada uno se extrae en un frasco tapa rosca de 100 ml previamente esterilizado una muestra del producto, finalizado el proceso de oxigenación. Se miden parámetros de porcentaje de oxígeno disuelto, pH y temperatura del biofertilizante de cada tanque a fin de complementar los análisis de aislamiento y compararlos con las condiciones actuales del biofertilizante. Para su traslado se conservó el bioinsumo en cadena de frío desde el lugar de producción hasta el laboratorio de microbiología ubicado en la Universidad Santo Tomas, sede Villavicencio para su análisis sin sobrepasar las 24 horas desde el muestreo, asegurando que la carga microbiológica se mantenga estable y viable.

4.2.2. Siembra inicial de microorganismos presentes en el biofertilizante: se realizó siembra en medio agar nutritivo (AN) debido a que es considerado un medio de cultivo básico para el crecimiento y mantenimiento de microorganismos requeridos, especialmente para bacterias y el desarrollo de pruebas bioquímicas, serológicas y de numeración (HiMedia Labs, 2022) así como en medio agar papa dextrosa (PDA) como medio general para el desarrollo de levaduras y mohos (Sagar, 2022); según indicaciones del producto y bajo el método de siembra masiva y/o directa por medio de micropipetas graduadas a 1 ml se suministró dicha cantidad a cada una de las cajas de Petri establecidas desde la muestra correspondiente para cada medio, en un entorno estéril y procurando no favorecer la contaminación durante de la siembra; igualmente y como se indica en la **figura 2**, se realiza siembra bajo el método en dilución en agua peptonada en una concentración  $10^{-3}$  al diluir tres veces la concentración de biofertilizante en una proporción de 1:10 para cada muestra extraída. Se destinan inicialmente ocho (8) cajas de Petri por tanque (cuatro (4) para medio AN, dos para siembra masiva y dos para siembra por dilución; cuatro (4) para medio PDA, dos para siembra masiva y dos para siembra por dilución) para un total de 48 cajas de Petri. Realizada la siembra, se procedió a incubar los medios de cultivo a una temperatura de 36 °C durante 48 horas. A continuación, se evidencia un diagrama ilustrativo de la prueba:

**Figura 2** Siembra inicial de microorganismos presentes en el biofertilizante



4.2.3. Prueba de aislamiento de microorganismos respecto a parámetros fisicoquímicos: se establece que los requerimientos a cumplir de las colonias sean iguales, bioquímicamente, a la de los géneros de bacterias *Azotobacter*, *Rhizobium* y *Azospirillum* caracterizadas por ser catalasa y oxidasa positivo debido a su proceso característico de respiración celular aerobia (Ariza, Jacqueline, & Gonzalez, 2020). Para ello, se evaluaron macroscópicamente las cepas presentes en cada caja de Petri, priorizando las que sean de apariencia cremosa, de color blanco, amarillo o grisáceo, y que su presencia sea repetitiva en cada uno de los ensayos, considerándolas de interés para el análisis de pruebas bioquímicas de catalasa y oxidasa. Las colonias que en la prueba de catalasa y oxidasa dieron como resultado positivo, fueron llevadas para análisis microscópico bajo tinción de Gram, seleccionándose para siembra de aislamiento en medio agar levadura manitol (LMA), las que dieron principalmente como resultado Gram negativos.

4.2.4 Identificación de bacterias fijadoras de nitrógeno: para la siembra en LMA<sup>1</sup> (medio indicado para el crecimiento de bacterias sintetizadoras del nitrógeno debido a que su composición

<sup>1</sup> Las unidades formadoras de colonia aisladas en el medio agar levadura manitol se incuban a 36 °C durante 48 horas.

de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (0,5gr),  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  (0,2gr),  $\text{CINa}$  (0,1gr), extracto de levadura (1gr), manitol (1gr), agar (15gr) y agua destilada proporciona el alimento indicado para dichos microorganismos (Tabusso, 1998)) se priorizaron las colonias que además de cumplir con los parámetros para el aislamiento, crecieron principalmente en el medio AN, ya que al ser específico para el cultivo de bacterias se le destinó mayor número de repeticiones que aquellas cepas seleccionadas de los medios PDA. Se requirió de repetir las pruebas oxidasa y catalasa, así como el análisis microscópico bajo tinción de Gram con el objetivo de confirmar si son Gram negativas y si al compararlas macro y microscópicamente presentan similitud con los géneros de bacterias fijadoras de nitrógeno de interés.

**4.3. Fase 3:** formación y proceso de nódulos como indicadores de su capacidad de fijación de nitrógeno.

El desarrollo de la tercera fase relacionó la aplicación del biofertilizante con la formación de nódulos en tres especies de leguminosas seleccionadas, respecto a la concentración del bioinsumo aplicado. Para ello se estableció el desarrollo de las siguientes actividades:

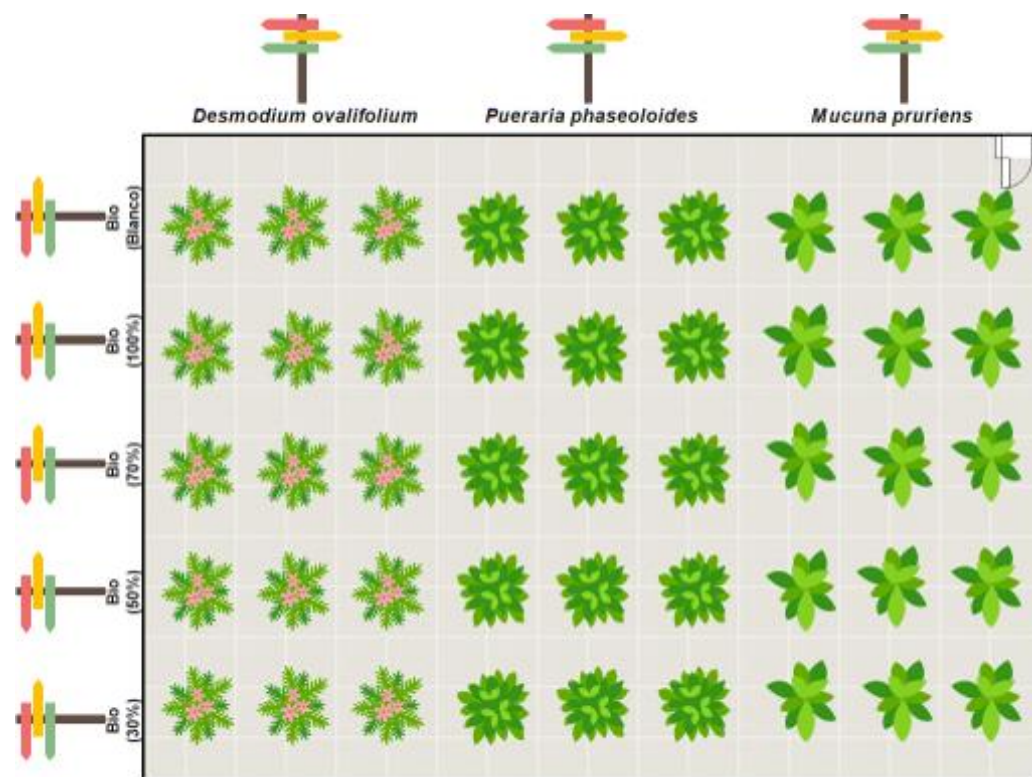
1. Aplicación de un diseño experimental de bloque al azar el cual permite analizar las unidades experimentales desde su heterogeneidad. Se establecen tres repeticiones por bloque, para la aplicación de los tratamientos en diferentes dosis de biofertilizantes (B: blanco; T1: al 100%, T2: al 70%, T3: al 50% y T4: al 30%), dando como resultado una muestra poblacional de 45 plantas de leguminosas divididas en las tres especies seleccionadas, *Desmodium ovalifolium*, *Pueraria phaseoloides* y *Mucuna pruriens*)<sup>2</sup> al ser propias del entorno natural del área de estudio **Ver figura 3.**
2. Para la prueba de procesamiento de nódulos se consideraron las técnicas descritas por el Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT) las cuales indican las siguientes pruebas de laboratorio.

---

<sup>2</sup>Los resultados obtenidos en relación con la cantidad de nódulos formados son evaluados bajo el método de análisis de varianza (ANOVA) y comparados bajo la técnica estadística de comparación de medias de Tukey.

- a. Caracterización del tamaño y número de nódulos in situ, así como el análisis de las raicillas nodulares sumergidas en con cloruro de calcio anhidro<sup>3</sup> para el estudio macroscópico que permite identificar la actividad microbiana, siendo positiva al visualizar una coloración rojiza en su interior como activo de la producción de leghemoglobina, la cual es descrita como una proteína esencial para la fijación de nitrógeno y está localizada en los nódulos de las leguminosas (CSIC, 2012).
- b. Siembra selectiva del macerado de los nódulos en agar de levadura manitol o LMA con indicador rojo congo (LMA-RC) para la identificación de microorganismos específicos en la fijación del nitrógeno, confirmados mediante las pruebas de oxidasa, catalasa y análisis microscópico bajo el método de tinción de Gram.

**Figura 3** Diagrama ilustrativo del diseño experimental



<sup>3</sup> Se selecciona por cada tratamiento las raíces con mayor formación de nódulos y descartando las raicillas secundarias. Se procesa a lavarlas con agua destilada y un frasco lavador y se almacena en tubos de ensayo con una solución de cloruro de calcio anhidro.

## 5. Análisis y discusión de resultados

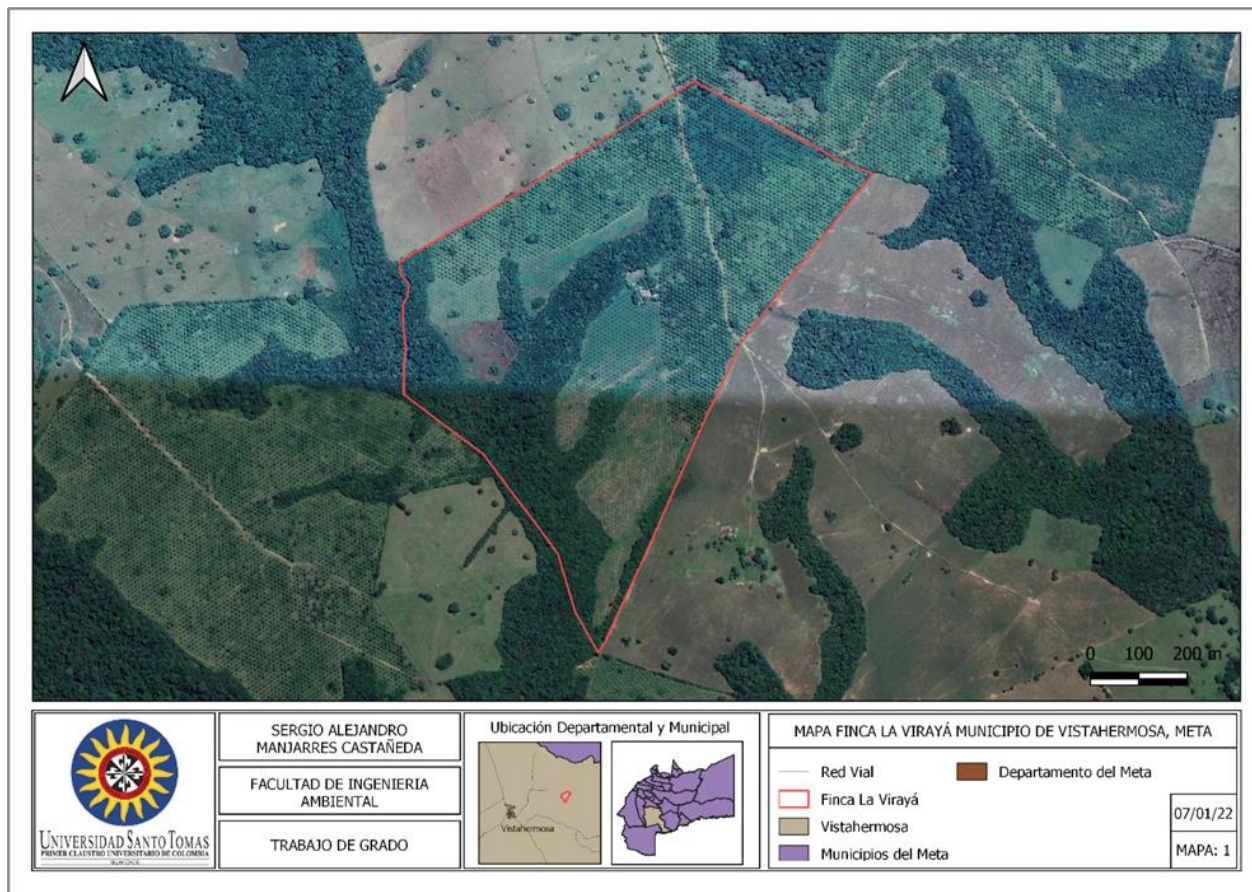
### 5.1. Descripción de la metodología establecida para la producción de biofertilizante

#### 5.1.1 Descripción del entorno de producción de biofertilizante

El municipio de Vista Hermosa, Meta, se encuentra localizado al Sur de la región del departamento, ubicado en la Latitud Norte 03°08'55" y Longitud Oeste 73°45'45", a una latitud de 301 m.s.n.m colindando con los municipios de San Juan de Arama, Puerto Lleras, La Macarena, La Uribe, Puerto Rico, Mesetas y San José del Guaviare (Ministerio de Ambiente y Desarrollo Sostenible, 2020). Respecto a su componente ambiental y/o biótico, se caracteriza por una amplia diversidad de flora y/o vegetación, la cual se extiende desde bosques primarios hasta selva húmeda tropical, con una significativa presencia de sotobosque el cual se caracteriza por la estancia de arbustos y palmas en zonas inundables, así como de bosque tropical semiseco conformado por comunidades de morichales en conjunto con formaciones de matorrales en alta presencia de arbustos leñoso, vegetación herbácea y líquenes. Por otra parte, aunque la presencia de fauna silvestre es característica de la región debido a la conformación de los seis ecosistemas estratégicos establecidos para el municipio (Área de Protección Hidrográfica, Zona de Bosques Protectores, Microcuencas Abastecedoras, Parque Nacional Natural La Macarena, Zona de Reproducción y Zona de Recuperación y Preservación) actualmente se considera que las especies animales propias de la zona presentan una baja densidad poblacional debido a los drásticos cambios efectuados en su hábitat, la alta persecución y depredación fruto de la caza y el tráfico ilegal (Alcaldía de Vista Hermosa, 2018). Dentro de la dimensión económica del municipio, la principal actividad se desarrolla en el primer sector de la economía, la agricultura, en donde sobresalen los cultivos de arroz, maíz, papaya, plátano, yuca, críticos y palma de aceite. Sobre la producción pecuaria la explotación se considera extensiva en bajo grado de tecnificación. Por otra parte, factores como el social resaltan que dicha actividad resulta la de mayor presencia debido a las tradiciones culturales de la región, aunque se han visto afectadas por la falta de tecnificación y la presencia del conflicto armado en la zona (Ministerio de Ambiente y Desarrollo Sostenible, 2020).

La influencia del proyecto comprende el área de la finca Virayá, allí se desarrollan actividades agrícolas como lo es la cosecha del fruto de palma africana (*Elaeis guineensis*) destinado para la producción del fruto requerido para la extracción de aceite de palma, el cual es empleado en la industria alimenticia, la manufactura de detergentes y cosméticos y en menor medida en la obtención de biocombustibles (WWF, 2022).

**Figura 4** Mapa del área del desarrollo e influencia del proyecto



Con 54,5 hectáreas en total y aproximadamente 32,4 hectáreas destinadas para el cultivo de palma, como parte del mantenimiento del cultivo se identifican tres especies de leguminosas destinadas para la conservación de la cobertura vegetal y las propiedades naturales del suelo, estas corresponden a la especie *Desmodium ovalifolium*, la cual aunque demuestra ser muy promisoría para los ecosistemas de la altillanura colombiana, el piedemonte amazónico y el piedemonte del departamento del Meta, las investigaciones indican que es propensa a sufrir problemas

fitosanitarios y una baja adaptabilidad a suelos intervenidos, la especie *Pueraria phaseoloides*, también conocida como Kudzu que se caracteriza como una planta perenne de crecimiento postrado y voluminoso lo que le permite convertirse en una excelente trepadora, y por último la especie *Mucuna pruriens* descrita como una leguminosa de extensa adaptabilidad, de crecimiento vigoroso y agresivo (Lemus & Lemus, 2015).

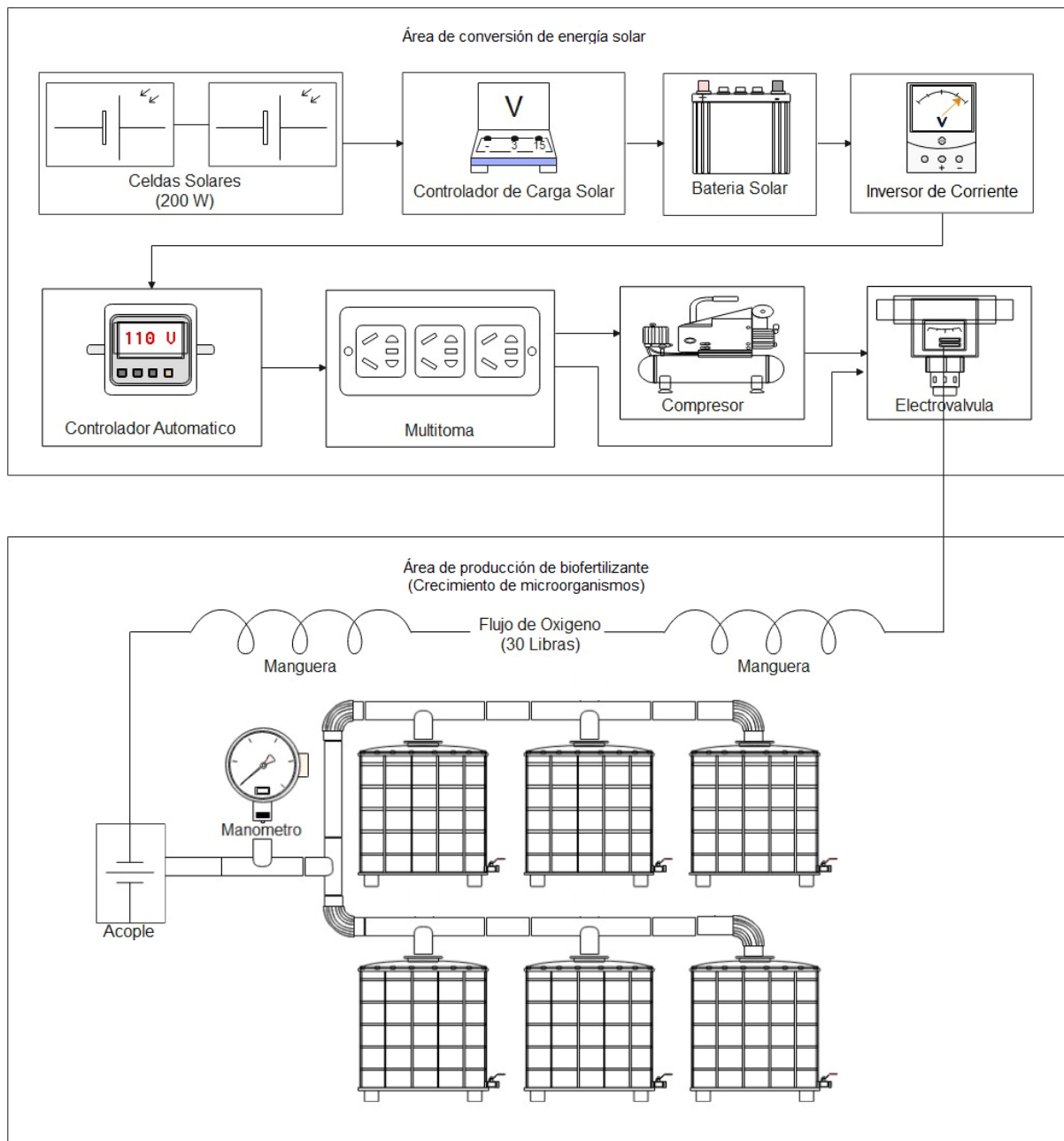
Cabe resaltar que el análisis de los factores bióticos resulta esencial ya que permite establecer su favorabilidad o no respecto a la reproducción de las especies de leguminosas las cuales juegan un papel fundamental en la fijación biológica del nitrógeno; los principales factores bióticos que influyen en el crecimiento y reproducción de forrajes son los microorganismos, que además de que pueden ser catalogados como benéficos o perjudiciales, intervienen en las reacciones del suelo al conducir nutrientes contenido en la materia orgánica del mismo, fijando el nitrógeno atmosférico. Así mismo, los animales también pueden favorecer o perjudicar el desarrollo de los forrajes, al facilitar o no las condiciones de aireación e infiltración y transportar material orgánico de un sitio a otro (Lemus & Lemus, 2015).

### **5.1.2 Proceso de producción del biofertilizante**

La producción de biofertilizante parte de la una metodología del informe *Memoria de curso de abonos orgánico* (Zárate, 2019) quien propone el empleo de insumos de origen orgánico como una alternativa al uso de agroquímicos, reduciendo el costo requerido por los agricultores y contrarrestado los efectos nocivos que tiene su uso sobre el medio ambiente. Para una producción de 100 litros de biofertilizante contenidos en (6) tanques de preparado de 1000 litros, se requiere de 1 kg de manto virgen del suelo de sotobosque propio de la finca Virayá como cepa inicial de microorganismos, 100 litros de agua sin cloro, 1,5 kilogramos de leguminosa molida como fuente de alimento de los microorganismos, que para el caso de la finca Virayá se emplea la especie *Mucuna pruriens* debido a la gran cantidad de masa foliar que prolifera en el predio y 5 litros de melaza como acelerador en la descomposición de la leguminosa (Sanclemente & Valencia, 2011). De igual manera se emplea un sistema de oxigenación a base de energía fotovoltaica (dicho sistema se encuentra indicado para la transformación de la energía solar en eléctrica a fin de activar por medio de un computador automático el compresor y la electroválvula que suministran el oxígeno)

requerido para la proliferación de microorganismos aerobios. A continuación, se visualiza un diagrama ilustrativo del proceso de producción adaptado:

**Figura 5** Diagrama ilustrativo de la producción de biofertilizante llevada a cabo en finca Virayá adaptado de Zárate (2019).



*Nota. Adaptado de Memoria de curso de abonos orgánico (Zárate, 2019)*

## 5.2. Análisis de las propiedades microbiológicas del biofertilizante

**Tabla 2** Parámetros fisicoquímicos del biofertilizante muestreado por cada tanque de producción

Parámetro	T1	T2	T3	T4	T5	T6
Oxígeno disuelto (%)	14,7	10,9	8,6	6,4	3,8	3,7
pH	4,833	4,814	4,775	4,672	4,675	4,804
Temperatura °C	26,45	26,25	26,18	26,95	25,6	26,05

A fin de complementar los análisis de caracterización y aislamiento de los microorganismos presentes en el biofertilizante en la *Tabla 2* se evidencian los parámetros de pH, oxígeno disuelto y temperatura al momento de extraídas las muestras de cada tanque, indicando que el porcentaje de oxígeno disuelto en los tanques de producción de biofertilizante no es uniforme, lo que compromete el crecimiento de las bacterias fijadoras de nitrógeno de interés al caracterizarse por su respiración celular aerobia (Britannica, 2022) y, por ende, la eficiencia de la relación de simbiosis dada entre la cantidad de los microorganismos aplicados por medio del biofertilizante y las raíces de las leguminosas se reduce.

De igual manera, se evidencia que el pH del biofertilizante tiende a ácido en todos los tanques de producción, lo que además de relacionarse con procesos de fermentación de bajo contenido de oxígeno disuelto, resulta desfavorable para la reproducción óptima de microorganismos al ser propicia especialmente en medios neutros (Ramos, 2018).

### 5.2.1 Selección de unidades formadoras de colonia para aislamiento

Al realizarse dos (2) repeticiones por cada ensayo de muestra microbiológica sembrada, se selecciona para el análisis macroscópico una de las dos repeticiones que presente un crecimiento de colonias significativo y concuerde con los a los parámetros estipulados, describiendo sus características a continuación:

**Tabla 3** Descripción macroscópica de las unidades formadoras de colonia por siembra directa

<b>Nombre de la caja</b>	<b>Forma</b>	<b>Borde</b>	<b>Color</b>	<b>Tamaño (mm)</b>	<b>Superficie</b>	<b>Consistencia</b>
<b>ANM1:M</b>	Circular	Irregular	Blanca	1 – 5	Lisa	Cremosa
<b>ANM2:M</b>	Irregular	Lobular	Blanca	10	Lisa	Mantequillosa
	Circular	Regular	Amarrillo	1 – 2	Lisa	Mantequillosa
<b>ANM3:M</b>	Irregular	Lobular	Blanca	1 – 20	Lisa	Mantequillosa
	Circular	Irregular	Amarillo	1 – 2	Lisa	Mantequillosa
<b>ANM4:M</b>	Circular	Regular	Blanca	1 – 4	Lisa	Mantequillosa
	Irregular	Lobular	Blanca	10 – 20	Lisa	Mantequillosa
<b>ANM5:M</b>	Irregular	Lobular	Blanca opaco	17 – 55	Lisa	Cremosa
	Circular	Irregular	Amarillo	1 – 2	Lisa	Mantequillosa
<b>ANM6:M</b>	Irregular	Lobular	Blanca	1 – 20	Rugosa	Mantequillosa
<b>PDAM1:M</b>	Puntiforme	Regular	Blanca opaco	1 – 2	Lisa	Mantequillosa
<b>PDAM2:M</b>	Circular	Irregular	Exterior blanco, interior amarillo	1 – 4	Lisa	Mantequillosa
<b>PDAM3:M</b>	Circular	Regular	Amarillo	1 – 2	Lisa	Mantequillosa
<b>PDAM4:M</b>	Circular	Puntiforme	Blanca opaco	0,5 – 1	Lisa	Mantequillosa
<b>PDAM5:M</b>	Circular	Irregular	Borde blanco, interior amarillo	1 – 4	Lisa	Seca
<b>PDAM6:M</b>	Irregular	Lobular	Blanca	1 – 5	Lisa	Mantequillosa

**Tabla 4** Descripción macroscópica de las unidades formadoras de colonia por siembra de dilución

<b>Nombre de la caja</b>	<b>Forma</b>	<b>Borde</b>	<b>Color</b>	<b>Tamaño (mm)</b>	<b>Superficie</b>	<b>Consistencia</b>
<b>ANM1:D</b>	Irregular	Nodular	Blanca crema	7	Lisa	Mantequillosa
<b>ANM2:D</b>	Irregular	Lobular	Blanca	1 – 20	Lisa	Mantequillosa
<b>ANM3:D</b>	Irregular	Nodular	Blanca crema	7	Lisa	Mantequillosa
<b>ANM4:D</b>	Irregular	Lobular	Blanca	1 – 20	Lisa	Mantequillosa
<b>ANM5:D</b>	Circular	Regular	Blanca	1 – 2	Lisa	Mantequillosa
<b>ANM6:D</b>	Irregular	Nodular	Blanca crema	40	Lisa	Cremosa
	Circular	Regular	Gris	1 – 2	Lisa	Mantequillosa
	Puntiforme agrupada	Regular	Blanca	0,5 – 1	Lisa	Cremosa
<b>PDAM1:D</b>	Puntiforme	Regular	Blanco opaco	1 – 2	Lisa	Mantequillosa
<b>PDAM2:D</b>	Circular	Filamentosa	Negro con filamentos	5 – 10	Lisa	Cremosa
<b>PDAM3:D</b>	Circular	Regular	Gris	1 – 2	Lisa	Cremosa
<b>PDAM4:D</b>	Puntiforme agrupada	Regular	Blanca	0,5 – 1	Lisa	Cremosa
<b>PDAM5:D</b>	Puntiforme	Rizado y folicular	Blanco opaco	30	Lisa	Cremosa
<b>PDAM6:D</b>	Circular	Filamentosa	Negro	5 – 30	-	-

Posteriormente, se seleccionan las cajas de Petri que poseen cepas de interés para los análisis bioquímicos de oxidasa y catalasa, respecto a sus características macroscópicas.

**Tabla 5** Cajas de Petri seleccionadas para análisis macroscópico y pos-selección de pruebas bioquímicas de catalasa y oxidasa

Muestras de biofertilizante	Siembra directa o masiva		Siembra en dilución 10 <sup>-3</sup>	
	Agar Nutritivo	Agar PDA	Agar Nutritivo	Agar PDA
<b>T1</b>	ANM1:M	PDAM1:M	ANM1:D	PDAM1:D
<b>T2</b>	ANM2:M	PDAM2:M	ANM2:D	PDAM2:D
<b>T3</b>	ANM3:M	PDAM3:M	ANM3:D	PDAM3:D
<b>T4</b>	ANM4:M	PDAM4:M	ANM4:D	PDAM4:D
<b>T5</b>	ANM5:M	PDAM5:M	ANM5:D	PDAM5:D
<b>T6</b>	ANM6:M	PDAM6:M	ANM6:D	PDAM6:D

\*Ver figura 2 sobre la codificación de las cajas de Petri. Las cajas de Petri marcadas en color gris se destinan para los análisis bioquímicos de catalasa y oxidasa.

La selección inicial permitió descartar colonias que, aunque macroscópicamente tenían características similares a bacterias de los géneros de interés, los resultados negativos en las pruebas de oxidasa y catalasa no las hacían óptima para su posterior aislamiento en medio LMA.

**Tabla 6** Cajas de Petra con colonias seleccionadas para siembra de aislamiento en medio LMA

Tipo de siembra	Nombre	Descripción breve	Oxidasa	Catalasa
<b>Siembra directa o masiva</b>	ANM1	Blanca irregular	Positivo	Positivo
	ANM2	Blanca lobular	Positivo	Positivo
	ANM4	Blanca irregular	Positivo	Positivo
	ANM6	Blanca lobular	Positivo	Positivo
	PDAM3	Amarilla circular	Positivo	Positivo
	PDAM4	Blanca puntiforme	Negativo	Negativo
<b>Siembra en dilución 10<sup>-3</sup></b>	ANM4	Blanca lobular* de ANM6	Positivo	Positivo
	ANM6	Blanca puntiforme agrupada* de PDAM3	Positivo	Positivo
	ANM6	Blanca irregular grande	Positivo	Positivo

Tabla 6. Continuación

ANM6	Grisácea circular* de PDAM4	Positivo	Positivo
PDAM4	Blanca puntiforme agrupada	Positivo	Positivo
PDAM6	Hongo negro	Negativo	Negativo

\*Colonias seleccionadas y aisladas de otras cajas de Petri.

En la **Tabla 6** se indican las colonias seleccionadas respecto al nombre que se indica en la caja de Petri, pero cabe resaltar que algunas colonias se extrajeron de otras cajas de Petri, debido a que durante las pruebas de selección inicial perdieron calidad, pero tanto física como bioquímicamente se consideraron similares, aunque cabe resaltar que dicho cambio pudo contribuir a un factor de contaminación durante o variación en los resultados. Aquellas que no fueron seleccionadas dieron como resultado en el análisis microscópico de tinción de Gram, Gram positivo o macroscópicamente no eran similares a las bacterias fijadoras de nitrógeno de interés que, según el estudio de Ariza, Jacqueline, & González (2020) se caracterizan por ser principalmente de apariencia cremosa, de color blanco, amarillo o grisáceo; así mismo tienen más relevancia las cepas presentes en el medio agar nutritivo *Ver tabla 7*.

**Tabla 7** Descripción y selección de colonias destinadas para aislamiento en medio LMA

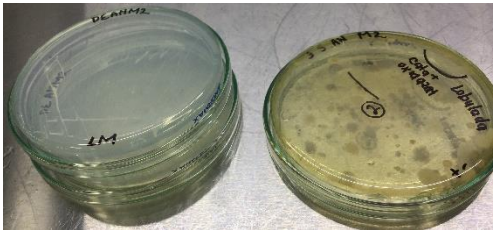
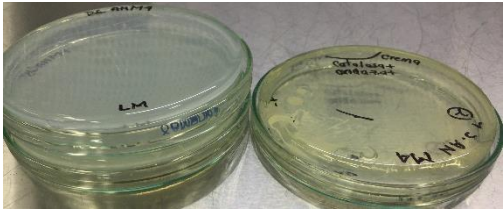
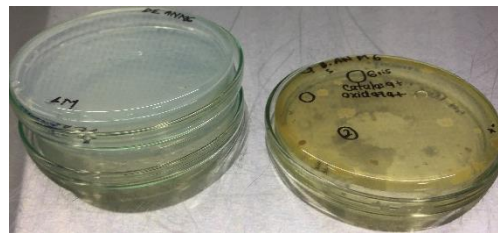
<b>Siembra Directa</b>	
<p><b>Caja de Petri: ANM2</b>  <b>Descripción de la Colonia:</b> La colonia seleccionada para aislamiento corresponde a la <i>Blanca Lobular</i> debido a su reacción positiva en las pruebas de catalasa y oxidasa. Para ello, se destinan dos cajas de Petri en medio LM.</p>	
<p><b>Caja de Petri: ANM4</b>  <b>Descripción de la Colonia:</b> La colonia seleccionada para aislamiento corresponde a la <i>Blanca Irregular</i> debido a su reacción positiva en las pruebas de catalasa y oxidasa. Para ello, se destinan dos cajas de Petri en medio LM.</p>	

Tabla 7. Continuación

**Caja de Petri: ANM6**

**Descripción de la Colonia:** La colonia seleccionada para aislamiento corresponde a la *Blanca Lobular* debido a su reacción positiva en las pruebas de catalasa y oxidasa. Para ello, se destinan dos cajas de Petri en medio LM.



**Caja de Petri: PDAM3**

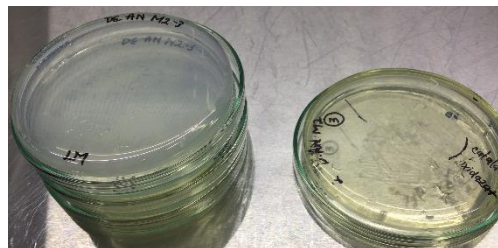
**Descripción de la Colonia:** La colonia seleccionada para aislamiento corresponde a la *Amarillo Circular* debido a su reacción positiva en las pruebas de catalasa y oxidasa. Para ello, se destina una caja de Petri en medio LM. Al darle menor relevancia al medio PDA.



**Siembra por Dilución 10<sup>-3</sup>**

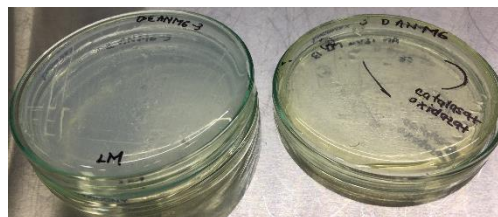
**Caja de Petri: ANM2 10<sup>-3</sup>**

**Descripción de la Colonia:** La colonia seleccionada para aislamiento corresponde a la *Blanca Lobular* debido a su reacción positiva en las pruebas de catalasa y oxidasa. Para ello, se destinan tres cajas de Petri en medio LM.



**Caja de Petri: ANM6 10<sup>-3</sup>**

**Descripción de la Colonia:** La colonia seleccionada para aislamiento corresponde a la *Blanca Irregular Grande* debido a su reacción positiva en las pruebas de catalasa y oxidasa. Para ello, se destinan dos cajas de Petri en medio LM.



**Caja de Petri: PDAM3 10<sup>-3</sup>**

**Descripción de la Colonia:** La colonia seleccionada para aislamiento corresponde a la *Blanca Puntiforme Agrupada* debido a su reacción positiva en las pruebas de catalasa y oxidasa. Para ello, se destinan una caja de Petri en medio LM.

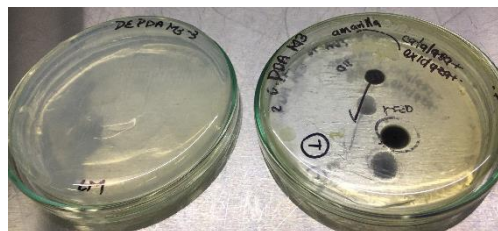
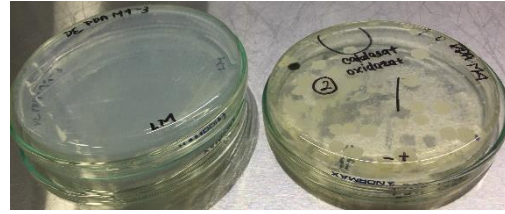


Tabla 7. Continuación

**Caja de Petri: PDAM4 10<sup>-3</sup>**

**Descripción de la Colonia:** La colonia seleccionada para aislamiento corresponde a la *Grisácea Circular* debido a su reacción positiva en las pruebas de catalasa y oxidasa. Para ello, se destinan dos cajas de Petri en medio LM.



**5.2.2 Análisis de resultados de la siembra de aislamiento en medio LMA**

**Tabla 8** Análisis microbiológico bajo el método de tinción de Gram de la siembra de aislamiento en medio LMA

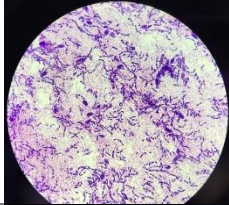
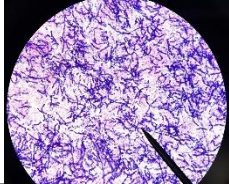

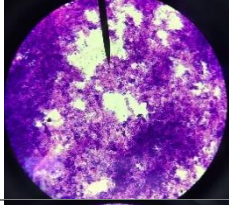
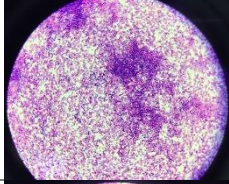
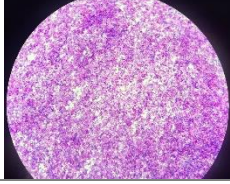
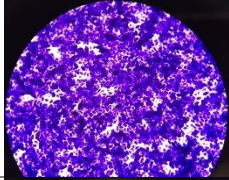

Tipo de siembra	Nombre	R	Oxidasa	Catalasa	Criterio de tinción de Gram	Registro fotográfico
<b>Siembra directa o masiva</b>	ANM2	2	Positivo	Positivo	Estreptobacilo +, Cocobacilos +, Cocos -	
	ANM4	2	Positivo	Positivo	Estreptobacilo +, Cocos -	
	ANM6	2	Positivo	Positivo	Cocos -	
	PDAM3	1	Positivo	Débilmente negativo	Cocobacilos +, Cocos -	
<b>Siembra en dilución 10<sup>-3</sup></b>	ANM2	3	Positivo	Positivo	Bacilos +, Cocos -	
	ANM6	2	Positivo	Positivo	Cocos -	

Tabla 8. Continuación

PDAM3	1	Positivo	Débilmente negativo	Cocobacilos +	
PDAM4	2	Positivo	Débilmente negativo	Cocobacilos +	

\*R: repeticiones.

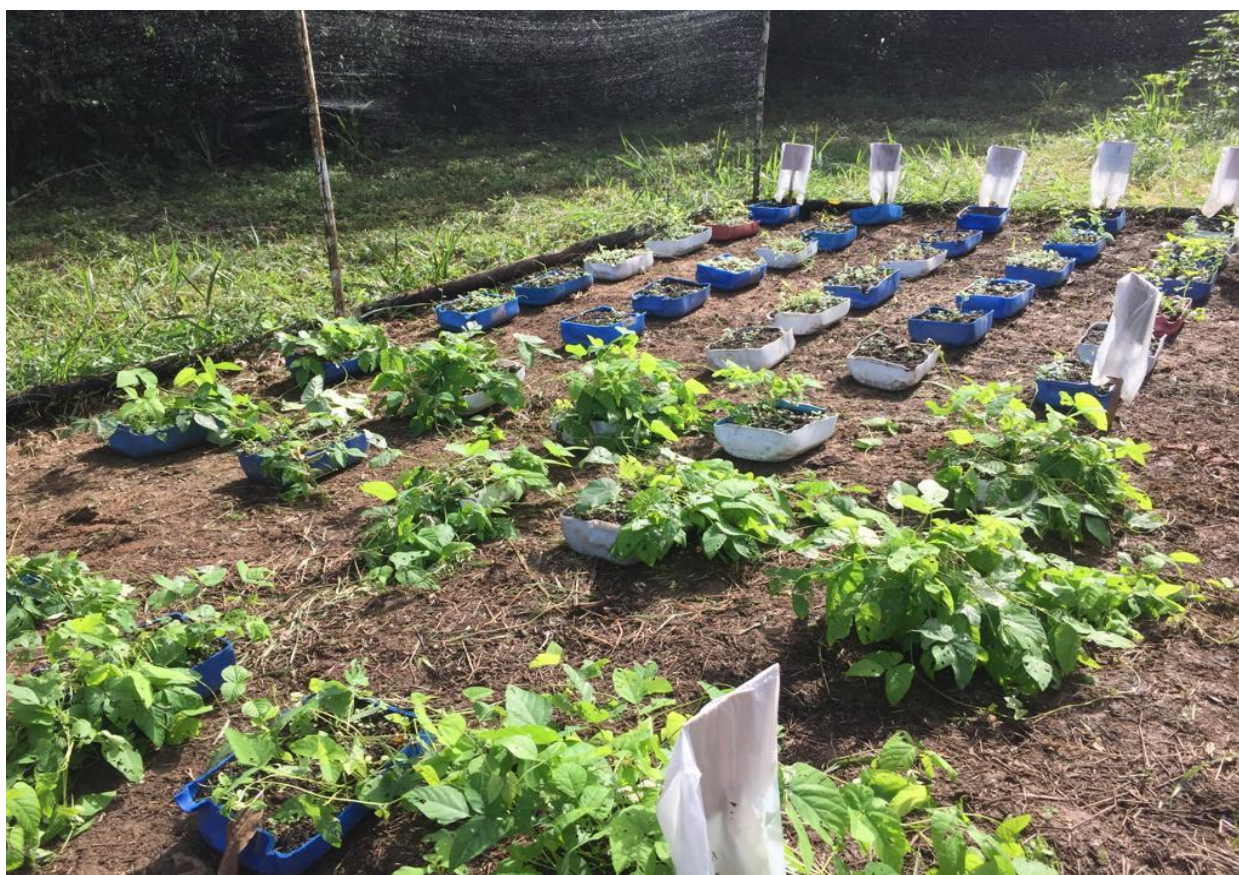
El análisis microscópico bajo el método de tinción de Gram indica que las colonias aisladas en el medio LMA provenientes del tanque (T6), nombradas en las cajas de Petri como ANM6 tanto en siembra masiva como en dilución  $10^{-3}$  en agua peptona, coinciden en su totalidad con los parámetros establecidos para la confirmación de bacterias fijadoras de nitrógeno en el biofertilizante producido en finca Virayá al consistirse principalmente por bacterias Gram negativas. Por otra parte, las cepas evaluadas de las cajas de Petri ANM2, ANM4 y PDAM3 de siembra masiva, y la caja de Petri ANM2 de siembra por dilución  $10^{-3}$ , aunque macroscópicamente se evidencia como una única colonia en el medio LMA, al visualizarlo en el microscopio se evidencian Bacilos +, Cocobacilos + o Estreptococos + con Cocos -, lo que indica contaminación, atribuida principalmente al que el bajo contenido de oxígeno el cual favorece el tránsito de la reproducción de microorganismos aerobios, como las bacterias fijadoras de nitrógeno, a aquellos de reproducción por fermentación anaerobia (Britannica, 2022), lo que con la liberación de compuesto ácido re acidifica el preparado de biofertilizante comprometiendo el medio para aquellos microorganismos de interés (Ramos, 2018).

En los medios PDA el crecimiento de hongos no resulto significativo y aunque se evaluaron algunas colonias catalogadas de interés, prevalece en la prueba catalasa el resultado débilmente negativo, lo que para el caso de las cajas de Petri de PDAM3 y PDAM4 en siembra por dilución  $10^{-3}$  coincide con las características contrarias a los parámetros de interés, confirmándose microscópicamente con su tinción de Gram positiva.

### 5.3. Análisis de la inoculación del biofertilizante respecto a la capacidad de fijación de nitrógeno de las tres especies de leguminosas seleccionadas

El desarrollo del diseño experimental planteado con las tres especies de leguminosas (*Desmodium ovalifolium*, *Pueraria phaseoloides* y *Mucuna pruriens*) sometidas a los cinco tratamientos indicados en un lapso aproximado de cuatro meses permitió visualizar el crecimiento de los especímenes en el entorno del área del proyecto *Ver figura 6*.


**Figura 6** Desarrollo del diseño experimental respecto al diagrama planteado en la metodología



Nota: los tratamientos en sentido horizontal y de derecha a izquierda (Blanco, T1: 100%, T2: 70%, T3: 50% y T4: 30%) y las especies de leguminosa en sentido vertical y de arriba abajo (*Desmodium ovalifolium*, *Pueraria phaseoloides* y *Mucuna pruriens*).

Posteriormente, y en el área del diseño se visualizaron, describieron, extrajeron y contabilizaron los nódulos pertinentes a cada especie de leguminosa según su tratamiento y repetición evidenciando los siguientes resultados:

**Tabla 9** Descripción in situ de los nódulos generados por cada especie de leguminosa

<p><b><i>Desmodium ovalifolium:</i></b></p> <p>Se identifican poca presencia y de pequeño tamaño entre 0,5 – 3 mm de los nódulos, resaltando la fragilidad de la planta y el desprendimiento de los nódulos a un simple contacto, particularmente para esta especie los nódulos, estos se encuentran ramificados.</p>	
<p><b><i>Pueraria phaseoloides:</i></b></p> <p>Se determinó que esta especie nos brinda nódulos con diámetros aproximados 2 – 5 mm, con la dificultad de desprendimiento con facilidad de estos y que llegan a salir secos o ya dañado el nódulo.</p>	
<p><b><i>Mucuna pruriens:</i></b></p> <p>Su crecimiento y desarrollo de nódulos fue notorio en diámetro variando aproximadamente entre 10 – 25 mm, de igualmente su cantidad se identifica como relevante. No presento desprendimiento o nódulos huecos.</p>	

**Tabla 10** Número de nódulos generados respecto la especie de leguminosa y la dosis de biofertilizante inoculado

Bloque	Repetición	B: blanco	T1: 100%	T2: 70%	T3: 50%	T4: 30%
<i>Desmodium ovalifolium</i>	R1	5	21	28	12	8
	R2	7	27	32	11	9
	R3	3	11	17	18	15
<i>Pueraria phaseoloides</i>	R1	4	8	11	8	16
	R2	2	29	27	7	12
	R3	0	17	15	11	17
<i>Mucuna pruriens</i>	R1	8	30	34	21	17

Tabla 10. Continuación

R2	4	63	68	18	11
R3	7	79	89	15	14

**5.3.1 Análisis de varianza y prueba de comparación de medias de Tukey**

El análisis de varianza (ANOVA) parte de establecer como hipótesis que al menos una de las concentraciones de biofertilizante tiene mayor incidencia en la producción de nódulos y que dicha producción varía entre las especies de leguminosa evaluadas.

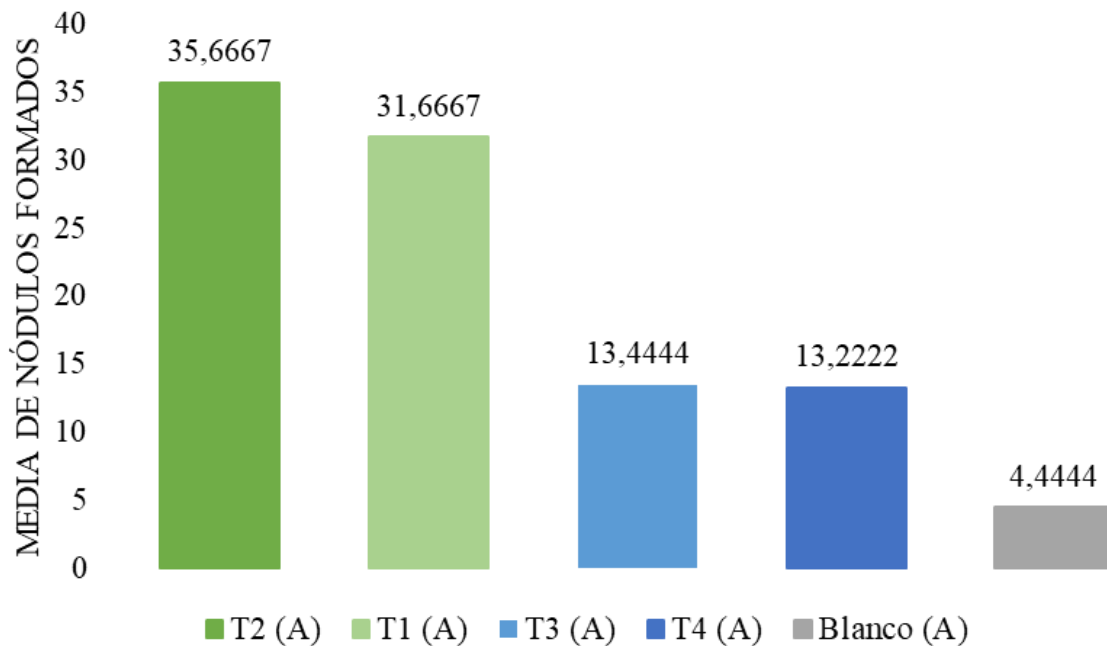
**Tabla 11** Análisis de varianza de la producción de nódulos respecto a la concentración de biofertilizante y la especie de leguminosa

Fuente de variabilidad	gL	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	Distribución $F_0$ calculada	Distribución $F_T$
Unidad experimental ( $\mu$ )	1	5814,79			
Tratamientos	4	2135,88	533,97	3,78	3,84
Bloques	2	1130,01	565,01	4,00	4,46
Error ( $\alpha:0,05$ )	8	1131,32	141,41		
Total	15	4397,21			

La técnica ANOVA, emplea la prueba de significación estadística mediante la distribución F, la cual indica que si  $F_0$  calculada es mayor a  $F_T$  la hipótesis se rechaza, pero si, por el contrario,  $F_T$  es mayor que  $F_0$  calculada la hipótesis se aprueba; por lo cual, y respecto al resultado evidenciado en la **Tabla 7** se considera que además de que una de las concentraciones de biofertilizante tiene mayor incidencia sobre la cantidad de nódulos generados específicamente el tratamiento T2 al haber obtenido los resultados medios más altos, una de las especies de leguminosa, que por los valores obtenidos se infiere corresponde a la especie *Mucuna pruriens*, presenta mejor producción en dicho aspecto. Dichas estimaciones se reafirman en la prueba de comparación de media de Tukey prevista a continuación:

Al determinar tanto el tratamiento más favorable junto con la especie de leguminosa que tuvo mejores resultados respecto a la cantidad de nódulos generados, la prueba de comparación de medias de Tukey indica los siguientes criterios:

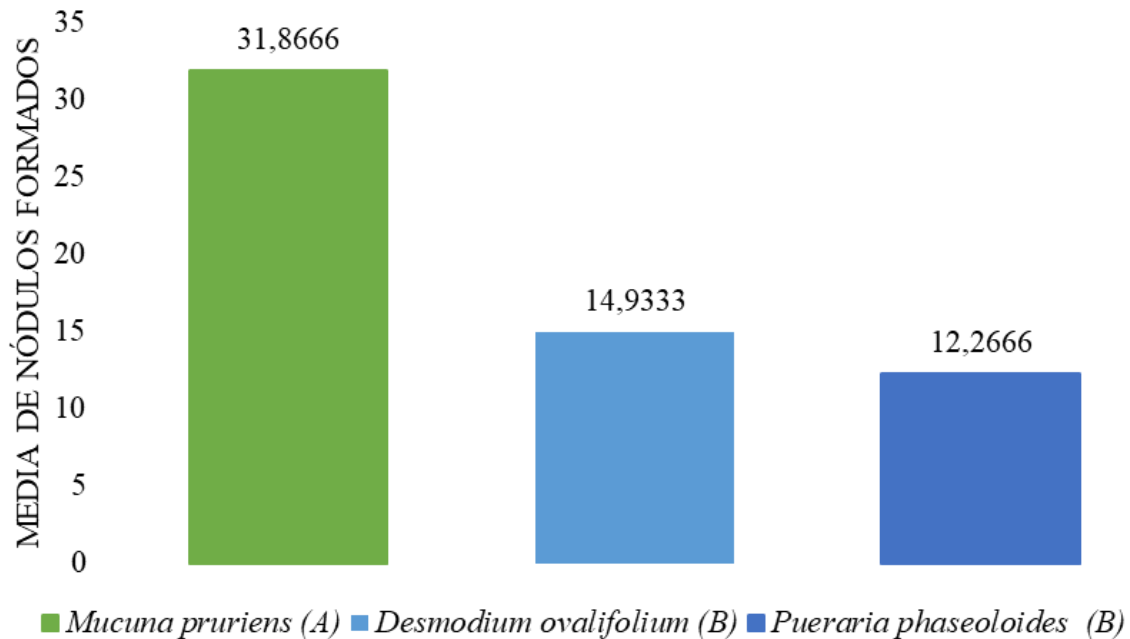
**Figura 7** Prueba de comparación de medias de Tukey para los tratamientos aplicados



Al comparar los valores medios de los tratamientos aplicados respecto a la cantidad de nódulos formados, se evidencia que, aunque todos los tratamientos son estadísticamente similares al no superar la diferencia mínima significativa entre ellos, los tratamientos T2 y T1, correspondientes a las concentraciones del 70 y el 100% de biofertilizante presentaron más del doble de producción de nódulos en comparación con los otros tratamientos, dichos resultados coinciden con los apuntes de Zárata (2019), quien indica que para emplear el preparado de biofertilizante específicamente para la inoculación de microorganismos al suelo, se debe de aplicar a mayor concentración. Así mismo se establece que los resultados del tratamiento **T2: 70%**, fueron más favorables debido a que la adición de una fracción de agua neutralizo el pH del biofertilizante, el cual se describe como ácido, favoreciendo la proliferación de microorganismo en la rizosfera del suelo y por ende el desarrollo del proceso nodular (Estrada, 2002). Cabe resaltar que el tratamiento de control (Blanco) al estar cinco veces por debajo de la media total de todos los tratamientos indica

que la aplicación del bioinsumo incide en gran medida en la formación de nódulos y por ende en la eficiencia del proceso de fijación biológica del nitrógeno.

**Figura 8** Prueba de comparación de medias de Tukey para las especies de leguminosas evaluadas



Respecto a la comparación de medias de las especies de leguminosas, la diferencia mínima significativa establecida en la prueba de Tukey indica que la especie de leguminosa *Mucuna pruriens* presenta los mejores resultados respecto a la formación de nódulos posterior a la inoculación con el biofertilizante, coincidiendo con las características de adaptación que presenta para el territorio nacional, al preferir entornos ubicados desde los 0 – 1600 m.s.n.m, a temperaturas altas entre 20 – 30 °C y precipitaciones de 1000 – 3500 mm anuales, así mismo presenta un buen crecimiento en diversidad de suelos, incluyendo aquellos con baja disponibilidad de nutrientes, arenosos y/o arcilloso y con pH superiores a 4,5 (Lemus & Lemus, 2015) como los de la finca Virayá.

Por otra parte, las especies *Desmodium ovalifolium* y *Pueraria phaseoloides* al no superar la diferencia mínima significativa establecida entre ellas se consideran estadísticamente iguales y aunque presentan una fuerte demanda en el mercado agrícola regional por la capacidad de aporte

nutrimental que poseen, ambas se reproducen con mayor facilidad en suelos francos, neutros y en condiciones constantes de lluvia debido a su baja resistencia contra las sequías (Lemus & Lemus, 2015).

### ***5.3.2 Prueba de procesamiento de nódulos producidos en las tres especies de leguminosas***

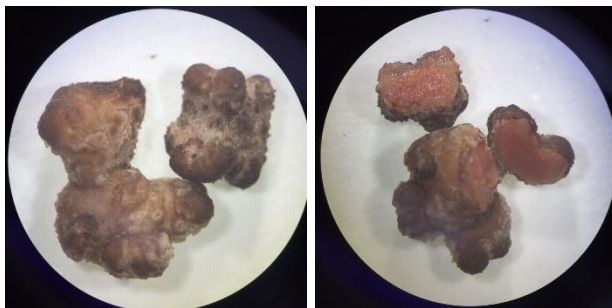
La prueba de procesamiento de nódulos realizada en laboratorio, posterior al recuento de los mimos en el área de estudio y bajo condiciones de esterilidad para siembra en LMA como se indica en la metodología, permite comparar la cantidad y tamaño de los nódulos generados por cada especie de leguminosa, respecto a la identificación de la coloración rojiza característica de la presencia de la proteína leghemoglobina; la cual permite establecer la relación activa de simbiosis, así como la fertilización autóctona de nitrógeno hacia las plantas hospederas (CSIC, 2012).

**Figura 9** Análisis macroscópico de la especie *Desmodium ovalifolium*



**Figura 10** Análisis macroscópica de la especie *Pueraria phaseoloides*



**Figura 11** Análisis macroscópico de la especie *Mucuna pruriens*

La observación de los nódulos indica que además de variar de tamaño, cantidad y formación nodular, la coloración interna no es la misma para todos los ejemplares. Detalladamente, se confirma la activación de los nódulos en la especie *Desmodium ovalifolium* al visualizar la coloración rojiza representativa, y se diferencian de los demás al formarse esencialmente como racimos en la parte superior de las raíces, sobre todo en las más cercanas al tallo. Por otra parte, para la especie *Pueraria phaseoloides*, durante la extracción se observó algunos nódulos huecos y con alto desprendimiento de la raíz y durante la evaluación macroscópica en laboratorio se presenció la coloración rojiza principalmente en los nódulos pequeños, pero para los más grandes se le atribuye una coloración marrón a gris. Respecto a los nódulos de la especie *Mucuna pruriens*, además de destacar por la mayor cantidad de nódulos formados, presentan el mayor tamaño y la coloración rojiza más significativa, a tal punto que el líquido en donde se contenían para su traslado al laboratorio se tornó de dicho color.

Considerando lo anterior, se identifica que la forma de los nódulos usualmente varia respecto a la especie de leguminosa y aquellos nódulos que se encuentran muertos, inactivos o cesantes presentan en su interior una coloración marrón o verde grisácea (Pommeresche & Hansen, 2017). Por lo cual se puede afirmar que la especie *Pueraria phaseoloides* presenta signos de muerte nodular.

Acorde con las actividades planteadas dentro de la fase tres, a continuación, se registran los análisis microscópicos bajo el método de tinción de Gram de los nódulos macerados de las tres especies de leguminosas, donde como resultado los siguientes criterios.

**Tabla 12** Análisis microbiológico bajo el método de tinción de Gram de la siembra del procesamiento de nódulos en medio LMA



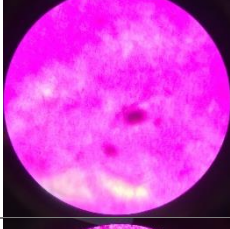
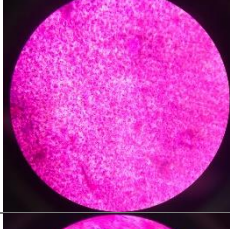

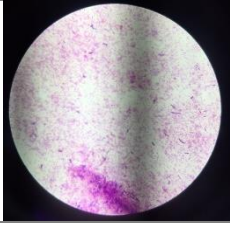
<b>Tratamiento</b>	<b>Prueba Oxidasa</b>	<b>Prueba Catalasa</b>	<b>Criterio de tinción de Gram</b>	<b>Registro fotográfico</b>
<i>Desmodium ovalifolium</i>				
<b>Blanco</b>	Positivo	Positivo	Bacilos -	
<b>T1</b>	Positivo	Débilmente negativo	Cocos -	
<b>T2</b>	Positivo	Positivo	Cocos -	
<b>T3</b>	Positivo	Positivo	Cocos -	
<b>T4</b>	Positivo	Positivo	Cocos -	
<i>Pueraria phaseoloides</i>				
<b>Blanco</b>	Positivo	Positivo	Cocos -, Bacilos +	

Tabla 12. Continuación

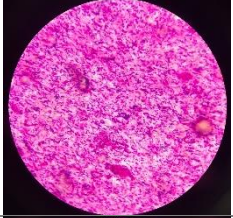
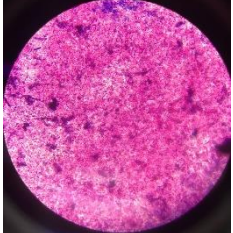
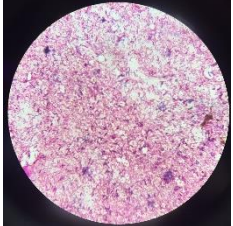
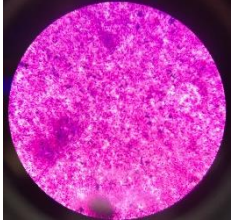
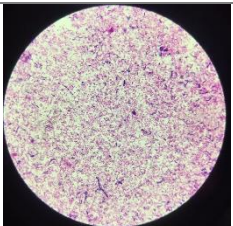
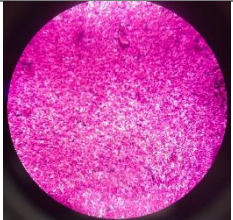

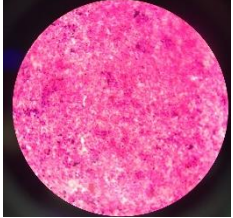

<b>T1</b>	Positivo	Positivo	Bacilos -, Bacilos +	
<b>T2</b>	Positivo	Positivo	Cocos -, Cocos +	
<b>T3</b>	Positivo	Positivo	Bacilos -, Bacilos +	
<b>T4</b>	Positivo	Débilmente negativo	Cocos -	
<b><i>Mucuna pruriens</i></b>				
<b>Blanco</b>	Positivo	Positivo	Bacilos +, Cocos -	
<b>T1</b>	Positivo	Positivo	Cocos -	
<b>T2</b>	Positivo	Positivo	Cocos -	

Tabla 12. Continuación

<b>T3</b>	Positivo	Débilmente negativo	Cocos -	
<b>T4</b>	Positivo	Positivo	Cocos -	

Cabe resaltar, que, aunque en la totalidad de las observaciones se identificaron bacterias Gram negativas, para el caso de la especie *Pueraria phaseoloides* se visualizan cocos y bacilos Gram positivos, que además de ser indicativos de contaminación contrastan con el hecho de que presentaron los resultados más desfavorables en la cantidad de nódulos producidos, el análisis macroscópico en campo y en la identificación de la proteína leghemoglobina, como indicador de la relación de simbiosis vital para la fijación biológica del nitrógeno.

Finalmente, se identifica que los tanto los resultados de identificación microbiológica de las bacterias de interés junto con el incremento del número de nódulos en todos los tratamientos comparados con el de control (Blanco), es consecuente con la incidencia del bioinsumo sobre la producción de nódulos los cuales corresponden a la inoculación de las bacterias fijadoras de nitrógeno presentes en el biofertilizante.

## 6. Impacto social y humanístico del proyecto

Dentro de las problemáticas vinculadas a la agricultura, el manejo inadecuado de agroquímicos conlleva a la acumulación de metales pesados, eutrofización del agua y acumulación de nitrato, ocasionando un riesgo latente para los habitantes de las zonas rurales en el consumo de agua potable (Gines & Navarro, 2014). Las estadísticas entorno a la agricultura química o convencional del país registran una variedad de agroinsumos conformados a partir de al menos de 128 ingredientes activos diferentes, representando un consumo de más de 40000 ton, lo cual incrementa los costos de producción para grandes agricultores como campesinos (Rosero, 2013). Los datos del Instituto Colombiano Agropecuario (ICA) reportan que para inicio de la década entre el 36-40% de la población colombiana se encontraba expuesta directamente a los pesticidas, sin mencionar la exposición indirecta a la cual la población del país se encuentra, por el consumo multitudinario de alimentos contaminados. Por otra parte, Montes & Ávila (2013) resaltan que, a nivel nacional, la seguridad alimentaria se ve comprometida por la presencia de poblaciones rurales diseminadas en suelos degradados, los cuales intervienen en la economía de sus hogares al evidenciar un descenso constante de su productividad y obligan a las familias de campesinos y agricultores a buscar alternativas económicas desplazándose a los centros urbanos y reduciendo el desarrollo agrícola de las regiones. Por lo cual este proyecto de investigación contribuye al desarrollo y mejora de las metodologías planteadas para la sustitución de fertilizantes químicos, que además de incidir sobre la calidad ambiental, la salud de las poblaciones y la conservación del entorno natural, representa un alto costo para los agricultores de la región, lo que se intensifica aún más debido al alza en un 100 a 180% de los fertilizantes nitrogenados, como la urea y el amoniaco a raíz de los conflictos socioeconómicos actuales como el presentado en el país de Ucrania (Hernández, 2022). Por ello, representan una oportunidad para el desarrollo agrícola en base a principios de sostenibilidad al favorecer a nivel socioeconómico, disminuyendo costos de fertilizantes y mejorando calidad de vida de agricultores. De igual manera, el avance de este y otros proyectos vinculados con la finca palmera Virayá, han permitido postularla como una “Parcela Demostrativa” ante la Federación Nacional de Palmicultores, con el objetivo de fomentar el desarrollo de técnicas relacionados con la producción sostenible de palma aceitera, mientras se otorga un valor agregado a la producción de cultivo.

## 7. Conclusiones

Al considerar los resultados se establece que los obtenidos en cada una de las fases son congruentes entre ellos mismos, por lo que se llega a las siguientes conclusiones:

El entorno del área del proyecto, tanto aquel que está destinado para el cultivo como el que se encuentra aun sin intervenir influye en el desarrollo de la metodología de producción del biofertilizante y como este actúa como inoculante enfocado en el aporte de la relación simbiótica de microorganismos fijadores de nitrógeno. Así mismo se logra establecer que, aunque el sistema de producción del biofertilizante se encuentra planteado con el objetivo de sustituir en su totalidad el uso de fertilizantes químicos nitrogenados, requiere de efectuarse mejoras en el porcentaje de oxígeno disuelto y el pH del preparado con el objetivo de favorecer la reproducción de bacterias fijadoras de nitrógeno en el medio.

Por otra parte, y respecto a la incidencia del biofertilizante producido y suministrado en la finca Virayá el incremento de la nodulación en las raíces de las tres especies de leguminosas como indicador de la relación simbiótica entre los microorganismos y la planta (relación fundamental para la fijación biológica del nitrógeno), se evidencia que su incidencia resulto significativa al contribuir en el aumento de la cantidad de los nódulos formados. Respecto a las variaciones en los tratamientos, principalmente entre el tratamiento T1:100% y T2:70% se infiere que los resultados obtenidos corresponden a la aplicación de microorganismos previamente identificados en el bioinsumo respecto al incremento de la acidificación del suelo al aplicar el biofertilizante; permitiendo concluir, que la dosis ideal para emplearlo como inoculante corresponde a la del 100% y/o puro siempre y cuando cumpla con las características de pH óptimas. Cabe resaltar que se requiere de establecer condiciones favorables para la producción del bioinsumo a fin de incrementar la concentración real de microorganismos, la cual aún se desconoce.

Finalmente, respecto a las especies de leguminosas se puede afirmar que aquella que presento mayor respuesta a la aplicación del fertilizante corresponde a la de la especie *Mucuna pruriens* principalmente a que sus características la hacen más resistente al entorno representativo de la zona. En cambio, la especie *Desmodium ovalifolium*, pero principalmente la especie *Pueraria*

*phaseoloides*, aunque sí tuvieron incrementos en la cantidad de nódulos formados indican una alta susceptibilidad a las condiciones medio ambientales impidiendo su desarrollo óptimo.

## 8. Recomendaciones

Se considera necesario efectuar la caracterización microbiológica de los organismos autóctonos del suelo empleado como cepa inicial en la producción del biofertilizante a fin de cuantificar y establecer su potencial real para el suministro de cepas indicadas para el desarrollo de biofertilizantes y/o bioinoculantes capaces de generar relaciones de simbiosis, a diferentes escalas.

Por otra parte, al considerar que la especie de leguminosa *Mucuna pruriens* se prolifera favorablemente en el área del proyecto debido a su adaptabilidad respecto a las condiciones medio ambientales de la región, se recalca la importancia de efectuar acciones que permitan mantener un control constante de su población (como es el desarrollo de podas y el manejo de las mismas como materia prima para la producción de abonos verdes), impidiendo así que se torne en un problema de tipo fitosanitario que imposibilite el adecuado desarrollo del cultivo de palma africana e incluso perjudique el entorno no intervenido del área.

En caso de que se desee incorporar otras especies de leguminosas es necesario evaluar las características actuales del suelo respecto a los requerimientos de estas; ya que esto implica en la posibilidad de aplicar tratamientos enfocados al acondicionamiento del suelo.

Finalmente, respecto a la producción del biofertilizante llevado a cabo en la finca Virayá se recomienda incrementar el suministro uniforme de oxígeno en el preparado de biofertilizante a fin de asegurar las condiciones óptimas de reproducción de los microorganismos en el medio. Esto se puede llevar a cabo por medio de procesos de agitación manual o mecánica y mejoras en el abastecimiento y dosificación del agua a medida que se incrementa el preparado del biofertilizante. De igual manera, y posterior al desarrollo de las adecuaciones indicadas para la mejora de la producción y/o características del biofertilizante se considera adecuado el llevar a cabo el análisis de recuento de bacterias, con el objetivo de estimar la proporción de microorganismos presente en la solución del bioinsumo, complementando al descripción de sus características y permitiendo evaluar con mayor grado de exactitud la relación entre la aplicado de estos microorganismos y la formación y producción de nódulos en las leguminosas.

## 9. Referencias

- Alcaldía de Vista Hermosa. (13 de marzo de 2018). Ecología. <http://www.vistahermosa-meta.gov.co/municipio/ecologia>
- Altieri, M. (2015). El enfoque agroecológico: el camino necesario. En S. Sarandón, & C. Flores, *Bases Agroecológicas para el Diseño y Manejo de Sistemas Agrícolas Sustentables* (pág. 55). Universidad Nacional de la Plata.
- Ariza Rodríguez, S., González Murillo, O. y López Sánchez, J. (2020). Evaluación de fijadores biológicos de nitrógeno libres sobre el crecimiento de gramíneas en suelo degradado. *Revista Colombiana de Biotecnología*, 22(1), 87–97. <https://doi.org/10.15446/rev.colomb.biote.v22n1.78019>
- Bellenger, J., Darnajoux, R., Zhang, X., & Kraepiel, A. (2020). *Biological nitrogen fixation by alternative nitrogenizers in terrestrial ecosystems: a review*. *Biogeochemistry*. <https://par.nsf.gov/servlets/purl/10192515>
- Britannica. (26 de abril de 2022). *Encyclopedia Britannica*. Obtenido de Biosynthesis, nutrition, and growth of bacteria: <https://www.britannica.com/science/bacteria>
- Chesworth, W. (2008). *Encyclopedia of Soil Science*. University of Guelph. Ontario, Canada: University of Guelph.
- CSIC. (2012). *Identificación de una proteína de leguminosa como evidencia de la producción de radicales libres*. Consejo Superior de Investigaciones Científicas. [https://www.csic.es/sites/default/files/7marzo2012\\_leguminosas\\_0.pdf](https://www.csic.es/sites/default/files/7marzo2012_leguminosas_0.pdf)
- Departamento Administrativo Nacional de Estadística. (2014). *Censo Nacional Agropecuario*. <https://www.dane.gov.co/index.php/estadisticas-portema/agropecuario/censo-nacional-agropecuario-2014#:~:text=Los%20resultados%20del%20censo%20mostraron,19.352.461%20millones%20de%20litros.>
- Estrada, J. (2002). *Pastos y Forrajes para el Trópico Colombiano*. Universidad de Caldas. Centro Editorial.

- FAO. (2017). *Soil Organic Carbon: the hidden potential*. Food and Agriculture Organization of the United Nations, Roma, Italy. <https://reliefweb.int/report/world/soilorganic-carbon-hiddenpotential#:~:text=Further%20damage%20to%20soil%20carbon,Organic%20Carbon%3A%20The%20Hidden%20Potential>.
- Fernandez Pascual, M. (2005). *Fijación Biológica el Nitrógeno: Factores Limitantes*. <https://digital.csic.es/handle/10261/128283>
- Gines, & Navarro. (2014). *Fertilizers: chemistry and action*. Mundi Prensa.
- Grageda-Cabrera, O., Díaz-Franco, A., Peña-Cabriales, J., & Vera-Núñez, J. (2012). *Impacto de los biofertilizantes en la agricultura*. Revista mexicana de ciencias agrícolas, 3(6), 1261-1274. [http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S2007-09342012000600015&lng=es&tlng=es](http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S2007-09342012000600015&lng=es&tlng=es).
- Grant, W. D., & Long, P. E. (2015). *Environmental Microbiology*. University of Leicester. Acribia.
- Hernández, E. (25 de febrero de 2022). *La invasión de Rusia a Ucrania dispara hasta 180% el precio de los fertilizantes*. <https://www.forbes.com.mx/invasion-rusiaucrania-dispara-precio-fertilizantes/>
- HiMedia Labs. (11 de abril de 2022). Nutrient Agar Medium. Obtenido de Biochemical Identification Media: <https://www.himedialabs.com/intl/en/products/100000153/Microbiology-DehydratedCulture-Media-Biochemical-Identification-Media>
- Hodson, & Zamudio. (2013). *Bioteconologías e innovación: El compromiso social de la ciencia*. Editorial Pontificia Universidad Javeriana.
- Igiehon, N., & Oluranti, B. (2018). *Rhizosphere microbiome modulators: contributions of nitrogen fixing bacteria towards sustainable agriculture*. South Africa: International journal of environmental research and public health. [https://www.researchgate.net/publication/323991471\\_Rhizosphere\\_Microbiome\\_Modulators\\_Contributions\\_of\\_Nitrogen\\_Fixing\\_Bacteria\\_towards\\_Sustainable\\_Agriculture](https://www.researchgate.net/publication/323991471_Rhizosphere_Microbiome_Modulators_Contributions_of_Nitrogen_Fixing_Bacteria_towards_Sustainable_Agriculture)
- Instituto Geográfico Agustín Codazzi. (2014). *Manejo de Suelos Colombianos*. Gobierno Nacional.

- Jupinder, K. (2022). *Chapter 8 - Bacterial inoculants for rhizosphere engineering: Applications, current aspects, and challenges*. Academic Press. 129-150. <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-89973-4.00004-1>
- Kamini, Chhavi, N. Raju, Yourmila, Surendra, Kiran, . . . Manoj. (2021). *Microbial biofertilizer: Types, applications, and current challenges for sustainable agricultural production*. Woodhead Publishing. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-821667-5.00014-2>
- Lemus, L., & Lemus, V. (2015). *Plantas de uso forrajero en el trópico*. Universidad de los Llanos.
- Mateusz, M., Agata, G., & Magdalena, F. (2020). *Biofertilizers in agriculture: An overview on concepts, strategies and effects on soil microorganisms*. Editor(s): Donald L. Sparks, *Advances in Agronomy*, Academic Press, Volume 162, (pp.31-87)
- Ministerio de Ambiente y Desarrollo Sostenible. (2020). *Documento Técnico de Soporte del Plan de Ordenamiento Territorial para el municipio de Vistahermosa, Meta*. Vistahermosa, Meta: Gobierno de Colombia. [https://visionamazonia.minambiente.gov.co/content/uploads/2021/04/1-DTS\\_DIAGN%C3%93STICO\\_-Vistahermosa.pdf](https://visionamazonia.minambiente.gov.co/content/uploads/2021/04/1-DTS_DIAGN%C3%93STICO_-Vistahermosa.pdf)
- Montes, Carmen & Ávila, William. (2013). *Medio ambiente y agricultura ecológica*. Corporación Bioma y Universidad Pedagógica y Tecnológica de Colombia.
- Pennock, D. &. (2016). World State of Soil Resources. *United Nations Food and Agriculture Organization*. <http://www.fao.org/3/i5126s/i5126s.pdf>
- Pommeresche, & Hansen. (2017). *Examinando la actividad de los nódulos en raíces de leguminosas*. Catanabria: FertilCrop.
- Ramos, L. M. (2018). *Caracterización físico - química del biofertilizante Microorganismos de Montaña (MM) para la Finca Agroecológica Santa Inés*. [Trabajo de grado, Escuela Agrícola Panamericana]. Repositorio. <https://bdigital.zamorano.edu/server/api/core/bitstreams/28c5819a-545c-4112-90cd-7edf2e920727/content>
- Rodríguez. (2018). *Agricultura Ecológica Aplicada. Tecnología en la agricultura moderna*. Revista ESSO Agrícola. Universidad Nacional de Colombia.

- Rosero. (2013). *Agricultura ecológica una práctica personal. Medio ambiente y agricultura ecológica*. Universidad Nacional de Colombia.
- Sagar, A. (13 de June de 2022). *Potato Dextrose Agar (PDA) - Principles, Uses, Composition, Procedure and Colony Characteristics*. <https://microbiologyinfo.com/potatodextrose-agar-pda-principle-uses-composition-procedure-and-colony-characteristics/>
- Sainju, Ghimire, R., & Pradhan, G. (2019). *Nitrogen Fertilization I: Impact on Crop, Soil and Environment*. IntechOpen. <https://www.intechopen.com/chapters/67454>
- Sanclemente, Ó., & Valencia, F. (2011). *Efecto del uso de melaza y microorganismos eficientes sobre la tasa de descomposición de la hoja de caña (Saccharum officinarum)*. *Revista De Investigación Agraria Y Ambiental*, 2(2), 13–19. <https://doi.org/10.22490/21456453.920>
- Tabusso, M. (1998). *Modificación del caldo extracto de levadura manitol para la producción a mediana escala de inoculantes para leguminosas*. *Revista Peruana De Biología* 5 (2):083-089. <https://doi.org/10.15381/rpb.v5i2.8323>.
- WWF. (16 de mayo de 2022). *WORLD WILD LIFE*. Obtenido de Sustainable Agriculture - Palm Oil: <https://www.worldwildlife.org/industries/palm-oil>
- Zárate, J. (2019). *AulaViva Tropical - Memoria de curso de abono orgánicos*. Lejanías, Meta: Centro de Formación en Innovación Campesina - FINCA.
- Zeballos, M. (2017). *Caracterización de microorganismos de montaña (MM) en biofertilizantes artesanales*. [Trabajo de grado, Escuela Agrícola Panamericana]. Repositorio. <https://bdigital.zamorano.edu/server/api/core/bitstreams/32881915-2d77-496a-b7cd-00bffb2a2eff/content>