



Esta obra está bajo una [Licencia Creative Commons Atribución- NoComercial-Compartirigual 2.5 Perú](http://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/2.5/pe/).

Vea una copia de esta licencia en <http://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/2.5/pe/>



UNIVERSIDAD NACIONAL DE SAN MARTÍN – TARAPOTO

FACULTAD DE CIENCIAS AGRARIAS

ESCUELA PROFESIONAL DE AGRONOMÍA



**Aislamiento y evaluación de la eficiencia simbiótica de rizobios de
Leucaena leucocephala (Lam.) de Wit y *Centrosema macrocarpum* benth.
bajo condiciones de invernadero**

Tesis para optar el título profesional de Ingeniero Agrónomo

AUTOR:

Jarol Neira Santa Cruz

ASESOR:

Dr. Winston Franz Ríos Ruiz

Tarapoto – Perú

2018

UNIVERSIDAD NACIONAL DE SAN MARTÍN-TARAPOTO
FACULTAD DE CIENCIAS AGRARIAS
ESCUELA PROFESIONAL DE AGRONOMÍA



**Aislamiento y evaluación de la eficiencia simbiótica de rizobios de
Leucaena leucocephala (Lam.) de Wit y *Centrosema macrocarpum* benth.
bajo condiciones de invernadero**

AUTOR:

Jarol Neira Santa Cruz

Sustentada y aprobada el 18 de mayo del 2018 ante el honorable jurado:


.....
Dr. Agustín Cerna Mendoza
Presidente


.....
Ing. Eybis José Flores García
Secretario


.....
Ing. Jorge Luis Peláez Rivera
Miembro


.....
Dr. Winston Franz Ríos Ruiz
Asesor

Declaratoria de Autenticidad

Jarol Neira Santa cruz, egresado de la Facultad de Ciencias Agrarias de la Escuela Profesional de AGRONOMÍA, de la Universidad Nacional de San Martín – Tarapoto, con DNI N° 70081060, con la tesis titulada: **Aislamiento y evaluación de la eficacia simbiótica de rizobios de *Leucaena leucocephala* (Lam.) de Wit y *Centrosema macrocarpum* benth. bajo condiciones de invernadero**

Declaro bajo juramento que:

1. La tesis presentada es de mi autoría.
2. He respetado las normas internacionales de citas y referencias para las fuentes consultadas. Por tanto, la tesis no ha sido plagiada ni total ni parcialmente.
3. La tesis no ha sido auto plagiada; es decir, no ha sido publicada ni presentada anteriormente para obtener algún grado académico previo o título profesional.
4. Los datos presentados en los resultados son reales, no han sido falseados, ni duplicados, ni copiados y por tanto los resultados que se presenten en la tesis se constituirán en aportes a la realidad investigada.

De considerar que el trabajo cuenta con una falta grave, como el hecho de contar con datos fraudulentos, demostrar indicios y plagio (al no citar la información con sus autores), plagio (al presentar información de otros trabajos como propios), **falsificación** (al presentar la información e ideas de otras personas de forma falsa), entre otros, asumo las consecuencias y sanciones que de mi acción se deriven, sometiéndonos a la normatividad vigente de la Universidad Nacional de San Martín – Tarapoto.

Tarapoto, 18 de mayo del 2018



Jarol Neira Santa cruz

DNI N° 70081060



Formato de autorización NO EXCLUSIVA para la publicación de trabajos de investigación, conducentes a optar grados académicos y títulos profesionales en el Repositorio Digital de Tesis

1. Datos del autor:

Apellidos y nombres: <i>NEIRA SANTA CRUZ JAROL</i>	
Código de alumno : <i>121112</i>	Teléfono: <i>939473412</i>
Correo electrónico : <i>jarolneirasantacruz@gmail.com</i>	DNI: <i>70081060</i>

(En caso haya más autores, llenar un formulario por autor)

2. Datos Académicos

Facultad de: <i>CIENCIAS AGRARIAS</i>
Escuela Profesional de: <i>AGRONOMIA</i>

3. Tipo de trabajo de investigación

Tesis	(<input checked="" type="checkbox"/>)	Trabajo de investigación	(<input type="checkbox"/>)
Trabajo de suficiencia profesional	(<input type="checkbox"/>)		

4. Datos de trabajo de investigación

Título: <i>AISLAMIENTO Y EVALUACIÓN DE LA EFICIENCIA SIMBIÓTICA DE RIZOBIOS DE LEUCENA LEUCORHIZA (LAM). DE Uti y Centrocema macrocarpum benth. BAJO CONDICIONES DE INVERNADERO</i>
Año de publicación: <i>2018</i>

5. Tipo de Acceso al documento

Acceso público *	(<input checked="" type="checkbox"/>)	Embargo	(<input type="checkbox"/>)
Acceso restringido **	(<input type="checkbox"/>)		

Si el autor elige el tipo de acceso abierto o público, otorga a la Universidad Nacional de San Martín – Tarapoto, una licencia **No Exclusiva**, para publicar, conservar y sin modificar su contenido, pueda convertirla a cualquier formato de fichero, medio o soporte, siempre con fines de seguridad, preservación y difusión en el Repositorio de Tesis Digital. Respetando siempre los Derechos de Autor y Propiedad Intelectual de acuerdo y en el Marco de la Ley 822.

En caso que el autor elija la segunda opción, es necesario y obligatorio que indiquen el sustento correspondiente:

6. Originalidad del archivo digital

Por el presente dejo constancia que el archivo digital que entrego a la Universidad Nacional de San Martín – Tarapoto, como parte del proceso conducente a obtener el Título Profesional o Grado Académico, es la versión final del trabajo de investigación sustentado y aprobado por el jurado.

7. Otorgamiento de una licencia *CREATIVE COMMONS*

Para investigaciones que son de acceso abierto se les otorgó una licencia *Creative Commons*, con la finalidad de que cualquier usuario pueda acceder a la obra, bajo los términos que dicha licencia implica.

<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/2.5/pe/>

El autor por medio de este documento, autoriza a la Universidad Nacional de San Martín – Tarapoto, publicar su trabajo de investigación en formato digital en el Repositorio Digital de Tesis, al cual se podrá acceder, preservar y difundir de forma libre y gratuita, de manera íntegra a todo el documento.

Según el Inciso 12.2, del Artículo 12° del Reglamento Nacional de Trabajos de Investigaciones para optar Grados Académicos y Títulos Profesionales –RENATI “**Las universidades, instituciones y escuelas de educación superior tienen como obligación registrar todos los trabajos de investigación y proyectos, incluyendo los metadatos en sus repositorios institucionales precisando si son de acceso abierto o restringido, los cuales serán posteriormente recolectados por el Repositorio Digital RENATI, a través del Repositorio ALICIA**”.



Firma del Autor

8. Para ser llenado en la Oficina de Repositorio Digital de Ciencia y Tecnología de Acceso Abierto de la UNSM-T.

Fecha de recepción del documento:

12/12/2019



Firma del Responsable de Repositorio
Digital de Ciencia y Tecnología de Acceso
Abierto de la UNSM-T.

***Acceso abierto:** uso lícito que confiere un titular de derechos de propiedad intelectual a cualquier persona, para que pueda acceder de manera inmediata y gratuita a una obra, datos procesados o estadísticas de monitoreo, sin necesidad de registro, suscripción, ni pago, estando autorizada a leerla, descargarla, reproducirla, distribuirla, imprimirla, buscarla y enlazar textos completos (Reglamento de la Ley No 30035).

****Acceso restringido:** el documento no se visualizará en el Repositorio.

Dedicatoria

Al creador de todas las cosas, el que me ha dado la fortaleza para continuar cuando a punto de caer he estado, por ello, con humildad que de mi corazón puede emanar, dedico mi trabajo primeramente a Dios.

La concepción de este trabajo está dedicada a mi madre, pilar fundamental en mi vida.

Que ha sabido formarme con buenos sentimientos, hábitos y valores, lo cual me ha ayudado a salir a delante en los momentos más difíciles.

Al hombre quien me dio la vida, el cual, a pesar de haberlo perdido a inicios de mis estudios profesionales, ha estado siempre cuidándome y guiándome desde el cielo. A mis hermanos que siempre han estado junto a mí y brindándome su apoyo, muchas veces poniéndose en el papel de padres.

A mi señorita enamorada compañera inseparable de cada jornada que gracias a su apoyo hizo de esta experiencia una de las más especiales.

Agradecimiento

Mi agradecimiento al Laboratorio de Microbiología Agrícola de la Universidad Nacional de San Martín-Tarapoto. Que me brindó la oportunidad de realizar el presente trabajo de investigación y de la cual siempre he recibido apoyo.

Al Dr. Winston Franz Ríos Ruiz, Asesor y Jefe de Laboratorio de Microbiología Agrícola por su apoyo para la terminación de esta tesis.

Al MSc. Renzo Valdez Nuñez por su dirección, paciencia, entrega y valiosos consejos que me permitieron alcanzar los objetivos de esta tesis.

En general, a todas las instituciones, organismos, bibliotecas que de alguna manera contribuyeron a facilitarme acceso a la información requerida para alcanzar los objetivos trazados en esta tesis.

Finalmente, a todas las personas y amigos que me brindaron su apoyo, tiempo e información para el logro de mis objetivos.

Índice general

	Págs.
Resumen	xiii
Abstract	xiv
Introducción	1
CAPITULO I: REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA.....	2
1.1. Fundamento teórico científico	2
1.1.1. El nitrógeno y su importancia	2
1.1.2. Fijación biológica de nitrógeno (FBN)	2
1.1.3. Fijación simbiótica de nitrógeno: leguminosa – rizobio.....	3
1.1.4. El proceso de nodulación	4
1.1.5. Resultados de investigaciones	6
1.2. Definición de términos básicos	7
CAPITULO II: MATERIAL Y MÉTODOS	9
2.1. Sistema de hipótesis	9
2.2. Sistema de variables	9
2.3. Tipos de método de la investigación	10
2.4. Diseño y análisis estadístico	10
2.5. Tratamientos estudiados	11
2.6. Ubicación del experimento	12
2.7. Metodología.....	13
2.5. Población y muestra.....	22
CAPÍTULO III: RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	23
3.1. Altura de planta alcanzadas para <i>L. leucocephala</i> y <i>C. macrocarpum</i>	25
3.2. Longitud de la raíz.....	27
3.3. Peso fresco total (mg)	30
3.4. Peso seco total para <i>L. leucocephala</i> y <i>C. macrocarpum</i>	31
3.5. Peso fresco de la raíz (PFR)	33
3.6. Peso fresco de nódulos (PFN)	35
3.7. Peso seco de nódulos (PSN)	36
3.8. Número de nódulos (NN)	38
3.9. Número de nódulos en raíz principal (NNRP)	41
3.10. Cantidad de Nitrógeno total (NT) por planta en (mg)	43

CONCLUSIONES.....	45
RECOMENDACIONES.....	46
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	47
ANEXOS.....	52

Índice de tablas

	Págs.
Tabla 1: Características morfocoloniales de cepas de <i>L. leucocephala</i>	23
Tabla 2: Características morfocoloniales de <i>C. macrocarpum</i>	24
Tabla 3: ANVA para alturas (cm) alcanzadas para <i>L. leucocephala</i> . y <i>C. macrocarpum</i> (transformado Vx)	26
Tabla 4: ANVA para longitud de la raíz alcanzadas para <i>L. leucocephala</i> y <i>C.</i> <i>macrocarpum</i> (transformado Vx).....	28
Tabla 5: ANVA para peso fresco total (mg) alcanzadas para <i>L. leucocephala</i> y <i>C.</i> <i>macrocarpum</i> (transformado Vx).....	30
Tabla 6: ANVA para peso seco total (mg) obtenidos para <i>L. leucocephala</i> y <i>C. macrocarpum</i> (transformado Vx)	32
Tabla 7: ANVA para peso fresco de la raíz (mg) obtenidos para <i>L. leucocephala</i> y <i>C.</i> <i>macrocarpum</i> (transformado Vx).....	33
Tabla 8: ANVA para peso fresco de nódulos (mg) obtenidos para <i>L. leucocephala</i> y <i>C.</i> <i>macrocarpum</i> (transformado Vx).....	35
Tabla 9: ANVA para peso seco de nódulos (mg) obtenidos para <i>L. leucocephala</i> y <i>C.</i> <i>macrocarpum</i> (transformado Vx).....	37
Tabla 10: ANVA para número de nódulos por planta obtenidos para <i>L. leucocephala</i> y <i>C. macrocarpum</i> (transformado Vx)	39
Tabla 11: ANVA para número de nódulos en raíz principal para <i>L. leucocephala</i> y <i>C.</i> <i>macrocarpum</i> (transformado Vx).....	41
Tabla 12: ANVA para Cantidad de nitrógeno total para <i>L. leucocephala</i> . y <i>C.</i> <i>macrocarpum</i> (transformado Vx)	43

Índice de figuras

	Págs.
Figura 1: Ejemplo del experimento completamente aleatorizados (DCA) de 3 repeticiones y 20 tratamientos. Cada tratamiento se repite una vez dentro de cada repetición.....	10
Figura 2: Muestreo de primeros 20 cm de superficie de suelo.....	13
Figura 3: Muestreo adecuado de suelo para análisis microbiológicos.....	14
Figura 4: Suelo expuesto a temperatura ambiente para su secado.....	15
Figura 5: Separación de restos vegetales del suelo recolectado.....	15
Figura 6: Sustrato suelo, vermiculita proporción 1:1.....	16
Figura 7: Desinfección y siembra de semillas de <i>L. leucocephala</i> y <i>C. macrocarpum</i> a) Alturas de hoyos, b) Desinfección de semillas con hipoclorito de sodio 3%, c) Siembra de semillas.....	17
Figura 8: Plántulas germinadas de <i>C. macrocarpum</i> a) 7 días después de la siembra. b) Plántulas de <i>L. leucocephala</i> a 8 días después de la siembra.....	17
Figura 9: Plantas de <i>C. macrocarpum</i> a los 60 días después de la siembra.....	18
Figura 10: Macetas de 5 kg conteniendo plantas de <i>L. leucocephala</i> a 60 días después de la siembra.....	18
Figura 11: a) planta de <i>C. macrocarpum</i> apta para la obtención de nódulos b) Retiro de la parte foliar de la planta. c) Obtención de masa radicular y nódulos.....	18
Figura 12: Almacenamiento de raíces y nódulos en bolsa de polipropileno b) Raíz libre de suelo, lista para obtener nódulos. c) Obtención de nódulos fisiológicamente.....	19
Figura 13: Nódulos desinfectados de <i>L. leucocephala</i>	20
Figura 14: Aislamiento de bacterias diazotroficas obtenidos de los nódulos de <i>L. leucocephala</i>	20
Figura 15: a y b) Inoculación de suelo diluido en semillas de <i>L. Leucaena</i> y <i>C. macrocarpum</i>	21
Figura 16: Prueba de Fisher ($P < 0,05$) para los promedios de altura en <i>L. leucocephala</i> a 80 dds.....	26
Figura 17: Prueba de Fisher ($P < 0,05$) para los promedios de altura en <i>C. macrocarpum</i> a 60 dds.....	27

Figura 18: Prueba de Fisher ($P < 0,05$) para Longitud de raíz en <i>L. leucocephala</i>	28
Figura 19: Prueba de Fisher ($P < 0,05$) para longitud de la raíz en <i>C. macrocarpum</i>	29
Figura 20: Prueba de Fisher ($P < 0,05$) para los promedios de peso fresco total en <i>L. leucocephala</i>	30
Figura 21: Prueba de Fisher ($P < 0,05$) para los promedios de peso fresco total en <i>C. macrocarpum</i>	31
Figura 22: Prueba de Fisher ($P < 0,05$) para los promedios de peso seco total en <i>L. leucocephala</i>	32
Figura 23: Prueba de Fisher ($P < 0,05$) para los promedios de peso seco total en <i>C. macrocarpum</i>	33
Figura 24: Prueba de Fisher ($P < 0,05$) para los promedios peso fresco de la raíz (mg) <i>L. leucocephala</i>	34
Figura 25: Prueba de Fisher ($P < 0,05$) para los promedios de peso fresco de la raíz en <i>C. macrocarpum</i>	34
Figura 26: Prueba de Fisher ($P < 0,05$) para los promedios de peso fresco de nódulos (mg) <i>L. leucocephala</i>	35
Figura 27: Prueba de Fisher ($P < 0,05$) para los promedios peso fresco de nódulos en <i>C. macrocarpum</i>	36
Figura 28: Prueba de Fisher ($P < 0,05$) para los promedios peso seco de nódulos (mg) <i>L. leucocephala</i>	37
Figura 29: Prueba de Fisher ($P < 0,05$) para los promedios peso seco de nódulos en <i>C. macrocarpum</i>	38
Figura 30: Prueba de Fisher ($P < 0,05$) para los promedios de número de nódulos <i>L. leucocephala</i>	39
Figura 31: Prueba de Fisher ($P < 0,05$) para los promedios de numero de nódulos de <i>C. macrocarpum</i>	40
Figura 32: Prueba de Fisher ($P < 0,05$) para promedios para número de nódulos en raíz principal para <i>L. leucocephala</i>	41
Figura 33: Prueba de Fisher ($P < 0,05$) para los promedios de número de nódulos en raíz principal para <i>C. macrocarpum</i>	42
Figura 34: Prueba de Fisher ($P < 0,05$) medida de la cantidad de nitrógeno total en mg para <i>L. leucocephala</i>	43
Figura 35: Prueba de Fisher ($P < 0,05$) para la cantidad de nitrógeno total en mg para <i>C. macrocarpum</i>	44

Resumen

En diversos ecosistemas, las leguminosas, en su gran mayoría, forman simbiosis con bacterias de diversos géneros, llamados colectivamente Rizobios las cuales tienen la capacidad de fijar nitrógeno atmosférico para ello el establecimiento de leguminosas eficientes en el uso de nitrógeno (N) es de vital importancia para la sostenibilidad y estabilidad de las producciones agropecuarias a través del tiempo. La región San Martín cuenta con 112 958 hectáreas de pasturas (DRASAM, 2016), las que “se encuentran en su mayoría con serios problemas de erosión; se suma a ello la ausencia de cobertura arbórea, el pisoteo constante del ganado (sobre pastoreo) y la erosión hídrica, esto afecta directamente a la sostenibilidad de la ganadería” debido a la degradación del suelo (Román *et al.*, 2007). Las especies *Leucaena leucocephala* y *Centrosema macrocarpum* producen cambios significativos en las propiedades físicas del suelo principalmente en densidad aparente, porosidad y resistencia a la penetración. El presente estudio fue ejecutado en el año 2016 y tuvo como objetivo el aislamiento, caracterización y evaluación de la eficiencia simbiótica de cepas de rizobios de *Leucaena leucocephala* y *Centrosema macrocarpum*, procedentes de suelos con pasturas degradadas del distrito de Cuñumbuque. Para ello se utilizó el diseño completo al azar con tres repeticiones y los tratamientos fueron de 18 cepas inoculadas con cepas de rizobios nativos, dos cepas control *Rhizobium leucaenae* y *Bradyrhizobium viridifuturi*, 2 controles nitrogenados no inoculados (100 y 50 mg N₂) y un control no inoculado y sin nitrógeno analizados con nivel de significancia de $p < 0,05$. Los resultados que se obtuvieron demostraron el efecto beneficioso de la inoculación con las cepas en las 2 especies evaluadas *Leucaena leucocephala* y *Centrosema macrocarpum*, para la altura de planta de *C. macrocarpum* obtuvo 98,93 cm, en longitud de la raíz en *L. leucocephala* fue de 100,30 cm, peso fresco total por planta en *L. leucocephala* 25616,7 mg, peso seco en *L. leucocephala* 1039,20 mg, peso fresco de la raíz con 2289,95 mg en *L. leucocephala*, número de nódulos con 95,75 en *L. leucocephala*, la cantidad de nitrógeno total por planta es mayor en la especie de *Leucaena* con un promedio de 34,83 mg.

Palabras Clave: *Leucaena leucocephala*, *Centrosema macrocarpum*, *Rhizobium*,

Abstract

In various ecosystems, legumes, for the most part, form symbiosis with bacteria of various genera, collectively called rhizobia which have the ability to fix atmospheric nitrogen for this purpose the establishment of efficient legumes in the use of nitrogen (N) is vital importance for the sustainability and stability of agricultural productions over time. The San Martín region has 112 958 hectares of pastures (DRASAM, 2016), which “are mostly with serious erosion problems; In addition, the absence of tree cover, the constant trampling of livestock (over grazing) and water erosion, this directly affects the sustainability of livestock "due to soil degradation (Román et al., 2007). *Leucaena* species, *leucocephala* and *Centrosema macrocarpum* produce significant changes in the physical properties of the soil mainly in apparent density, porosity and resistance to penetration. The following study was carried out in 2016 and aimed at the isolation, characterization and evaluation of the symbiotic efficiency of rhizobia strains of *Leucaena leucocephala* and *Centrosema macrocarpum*, from soils with degraded pastures of the Cuñumbuque district. For this, the complete randomized design with three repetitions was used and the treatments were 18 strains inoculated with native rhizobia strains, two control strains *Rhizobium leucaenae* and *Bradyrhizobium viridifuturi*, 2 non-inoculated nitrogen controls (100 and 50 mg N₂) and one control not inoculated and without nitrogen analyzed with significance level of $p < 0.05$. The results obtained showed the beneficial effect of inoculation with the strains in the 2 species evaluated *Leucaena leucocephala* and *Centrosema macrocarpum*, for the plant height of *C. macrocarpum* obtained 98.93 cm, in root length in *L. leucocephala* was 100.30 cm, total fresh weight per plant in *L. leucocephala* 25616.7 mg, dry weight in *L. leucocephala* 1039.20 mg, fresh root weight with 2289.95 mg in *L. leucocephala*, number of nodules with 95.75 in *L. leucocephala*, the amount of total nitrogen per plant is higher in the *Leucaena* species with an average of 34.83 mg.

Keyword: *Leucaena leucocephala*, *Centrocema macrocarpum*, *Rhizobium*.



Introducción

El suelo es un recurso natural de mucha importancia en la vida del hombre y fundamental en la producción de alimentos, por lo tanto, se debe mirar como una comunidad viviente más que como un cuerpo inerte (Sullivan, 2007).

La región San Martín cuenta con 112 958 hectáreas de pasturas (DRASAM, 2016), los que se encuentran en su mayoría en proceso de degradación por problemas serios de erosión hídrica, malas prácticas agronómicas; se suma a ello la ausencia de cobertura arbórea, el pisoteo constante del ganado, son factores que aceleran este proceso de degradación.

Por tal la incorporación de especies leñosas perennes en áreas ganaderas es de vital importancia, debido al impacto positivo en la producción de leche y carne. En un estudio realizado con sistemas silvopastoriles se encontró que la presencia de *L. leucocephala* en los potreros, permitió incrementar el contenido de nutrientes. Las concentraciones de nitrógeno, fósforo y carbono fueron superiores entre los 10 - 30 cm del suelo, a comparación de aquellos potreros donde la gramínea fue un monocultivo (Mahecha, 2009), esto gracias a la capacidad que poseen las leguminosas de formar simbiosis con bacterias fijadoras de nitrógeno atmosférico.

Por su parte *Centrosema macrocarpum* produce cambios significativos en las propiedades físicas del suelo principalmente en densidad aparente, porosidad y resistencia a la penetración (Lozano *et al.*, 2010).

En el trabajo se tuvo como objetivo principal el aislamiento, caracterización y evaluación de la eficiencia simbiótica de cepas de rizobios de *Leucaena leucocephala* y *Centrosema macrocarpum*, procedentes de suelos con pasturas del distrito de Cuñumbuque, esto se realizó con el propósito de mejorar la calidad de los suelos y por ende la productividad de los pastos para realizar una ganadería más sostenible, con resiliencia al cambio climático. Los resultados muestran que la mayor cantidad de nitrógeno se encontró en la especie *L. leucocephala* con la cepa C198 con 34,83 mg por planta y para *C. macrocarpum* cepa C142 con un 26,22 mg de nitrógeno por planta.

CAPÍTULO I

REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

1.1. Fundamento teórico científico

1.1.1. El nitrógeno y su importancia

El nitrógeno (N) es un elemento esencial para el desarrollo de los seres vivos constituyendo compuestos como proteínas, ácidos nucleicos, clorofila y otros componentes celulares. Si bien es uno de los elementos más abundantes de la atmósfera terrestre, representando 78%, no es accesible para la mayoría de los organismos ya que se encuentra en una forma muy estable de triple enlace (Tripathi, 2009).

El nitrógeno atmosférico (N₂) solamente se incorpora a los sistemas biológicos cuando ha sido reducido por un grupo de microorganismos fijadores de nitrógeno, denominados diazotrofos, o de manera artificial, cuando se combina el N₂ con ciertos elementos como el hidrógeno o el oxígeno formando nitrato (NO₃) o amonio (NH₄), bajo condiciones altamente energéticas, durante el proceso industrial de Haber -Bosch (Galloway *et al.*, 2004).

La fijación global de nitrógeno en el suelo se estima en unos 300 millones de toneladas (MT) al año. Por causas naturales (Descargas eléctricas, erupciones volcánicas y radiaciones ultravioletas) se fijan entre 3 y 10 MT. Mediante procesos de fijación industrial Haber -Bosch (dependiente de combustible fósil para el suministro de hidrógeno y energía) se fijan 100 MT, que son destinados principalmente a la producción de fertilizantes nitrogenados. Sin embargo, entre 100 a 300 MT son incorporados a través de la fijación biológica del N₂ (Field, 2004).

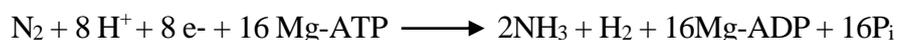
1.1.2. Fijación biológica de nitrógeno (FBN)

Consiste en la reducción del gas de nitrógeno (N₂) hasta NH₄⁺ y es un proceso exclusivo de procariontas. Entre estas bacterias y archeas fijadoras de N₂ denominadas diazotrofas y se pueden encontrar en vida libre, asociadas o en simbiosis con plantas (Bottomley y Myrold, 2015).

La FBN conforma el 63.6% del total de nitrógeno fijado anualmente. Donde la misma se descompone en 70 MT debido a diazotrofos en vida libre y 80 MT por asociaciones simbióticas, predominando el aporte de los cultivos de leguminosas herbáceas (como soja, tréboles y alfalfa) y de leguminosas arbóreas (De Felipe, 2006).

La FBN es catalizada por el complejo enzimático nitrogenasa que lleva a cabo el proceso de reducción de N₂. La enzima consta de dos metaloproteínas, una hierroproteína (Fe - proteína) y una hierro -molibdeno proteína (MoFe - proteína). Que contiene el sitio

activo para la reducción del sustrato y se organiza como un heterotetrámero $\alpha_2\beta_2$ de un peso molecular de 240 kDa. Consiste en 2 metaloclusters: el P-clúster (un clúster de [8Fe - 7S]) y el cofactor FeMo (Mo: 7Fe -9S: homocitrato) a nivel del cual ocurre la reducción del N₂. La Fe - proteína es un homodímero $\alpha\alpha$ de 60 kDa que contiene un solo clúster 4Fe - 4S y dos sitios de unión para MgATP y media el acoplamiento de la hidrólisis del ATP a la transferencia de electrones que serán donados al componente MoFe - proteína para producir la reducción del N₂ (Dixon y Kahn 2004). La reacción estequiométrica general que lleva a cabo esta enzima es la siguiente:



La FBN requiere un aporte considerable de ATP (al menos 16 moles de ATP por cada mol de N₂ fijado) que debe ser generado por fosforilación oxidativa, exigiendo una gran demanda de oxígeno. A pesar de esto, el complejo nitrogenasa resulta inactivo en presencia de oxígeno, por lo que los diazotrofos han adquirido una variedad de estrategias fisiológicas y morfológicas para proteger a la enzima del O₂ (Soto y Bace, 2001).

Los sistemas fijadores de N₂ son diversos y pueden alcanzar un alto grado de complejidad. Existen diazotrofos de vida libre y asociados en forma no simbiótica o en simbiosis con plantas. Dentro de las asociaciones no simbióticas encontramos diazotrofos interactuando en la rizósfera o en el interior de la raíz, tallo y hojas de las plantas (endófitos). Estos microorganismos se ven favorecidos por un microambiente con baja presión de oxígeno y alta disponibilidad de nutrientes carbonados, brindando a cambio nitrógeno fijado como NH₃ rápidamente asimilado por la planta. Por otro lado, las asociaciones simbióticas incluyen: 1. Cianobacterias que ocupan lugares estratégicos de hepáticas, helechos, cícadas y dicotiledóneas; 2. actinobacterias, como *Frankia*, que forma nódulos con muchos géneros de plantas no leguminosas; y 3. Los *rizobios* que forman nódulos en leguminosas. Estas últimas son consideradas las más eficientes en cuanto a la fijación de N₂ ya que aportan la mayor proporción del nitrógeno fijado a la planta (Lloret y Martínez, 2005) y se la denomina fijación simbiótica de nitrógeno (FSN).

La disponibilidad directa del N₂ fijado a la planta hace a la FSN un importante aporte de nitrógeno a los suelos agrícolas, contribuyendo de manera fundamental a la producción de alimentos para el hombre y animales y a la economía de fertilizantes nitrogenados. También mejora la fertilidad del suelo y su ecología, minimizando las pérdidas por volatilización, desnitrificación y lixiviación (Graham, 2000).

1.1.3. Fijación simbiótica de nitrógeno: leguminosa - rizobio

El proceso más importante de fijación de N₂ en la agricultura es la asociación simbiótica entre leguminosas y bacterias del suelo. Se estima que esta asociación fija en el orden de 20 a 22 Toneladas de N cada año (Herridge *et al.*, 2008).

También (Somasegaran y Hoben, 1994) menciona que los rizobios son bacterias que forman nódulos en la raíz, son de tamaño mediano, de forma abastionada, de 0,5 – 0,9 μm de ancho y de 1,2 - 3,0 μm de longitud, no forman endosporas, son Gram negativos y móviles por un simple flagelo polar o por dos o seis flagelos peritricos. Además, se diferencian en la velocidad de crecimiento diferenciándoles entre cepas de rápido *Rhizobium*, *Ensifer*, *Neorhizobium*, intermedio *Mesorhizobium* y lento crecimiento *Bradyrhizobium*. La taxonomía de rizobios actualmente es muy diversa (98 especies en 13 géneros), sin embargo, es posible diferenciar de acuerdo a su relación filogenética entre alfa-rizobios (*Rhizobium*, *Mesorhizobium*, *Ensifer*, *Bradyrhizobium*, *Phyllobacterium*, *Microvirga*, *Azorhizobium*, *Ochrobactrum*, *Methylobacterium*, *Devosia*, *Shinella* y beta-rizobios (*Burkholderia* y *Cupriavidus*) (Peix *et al.*, 2015).

La mayoría de las especies de la familia leguminosae forman esta asociación, y es especialmente frecuente en las subfamilias: Papilionaceae (13800 especies) y Mimosoideae (3270 especies) y escasa en Cesalpinoideae (2250 especies) (Legume Phylogeny Working Group, 2013). Esta familia comprende 751 géneros y 19500 especies, algunas de ellas de gran importancia por el aporte de proteínas en sus granos para el consumo humano, forraje para el ganado y como especies agroforestales. Las leguminosas de grano y forrajeras representan el 27% de la producción mundial de cultivos. Asimismo, se ha estimado que las leguminosas de grano constituyen el 33% del nitrógeno incorporado a la dieta humana (Graham y Vance, 2003).

1.1.4. El proceso de nodulación

El proceso de reconocimiento, infección y desarrollo de nódulos radicales entre rizobios y leguminosas involucra varias etapas: 1. El reconocimiento de la combinación adecuada planta - bacteria; 2. Adherencia de la bacteria a los pelos radicales; 3. Curvatura e invasión de los pelos radicales; 4. Formación de un canal de infección y desplazamiento de las bacterias hacia la raíz principal; 5. Proliferación celular y formación del nódulo maduro; 6. Diferenciación de las bacterias en bacteroides, formando la estructura llamada simbiosoma y su funcionamiento dentro del nódulo (Espinoza y Malpica, 2007).

1. Al inicio de la simbiosis el rizobio debe reconocer y responder a la presencia de las raíces de la planta hospedera. El rizobio se multiplica en la rizósfera y capta compuestos exudados de la planta como los flavonoides, y responde induciendo genes involucrados en la nodulación, denominados Factores Nodulantes (Masson, *et al.*, 2009).
2. Estudios sobre la adherencia de los rizobios a los pelos radicales sugieren que ocurre en dos etapas. En la primera ocurre una unión débil dependiente de calcio (Ca^{2+}) mediado por una proteína específica de adherencia, la ricadhesina, que se piensa está presente en la mayoría de los rizobios. La ricadhesina actúa captando complejos de calcio en la superficie de los pelos radicales. En una segunda etapa se da una unión estrecha mediada por la síntesis bacteriana de fibrillas de celulosa,

requeridas por *R. leguminosarum* para formar biofilms en los pelos radicales (Gage, 2004).

3. Una unión exitosa provoca cambios morfológicos visibles en la planta, producidos por la acción de los factores Nod (FNs). Los FNs inician varios de los cambios de desarrollo vistos en la planta hospedera en etapas tempranas del proceso de nodulación, incluyendo deformación del pelo radical, despolarización de la membrana de las células epidérmicas, oscilaciones de calcio intracelular y la iniciación de la división celular en el cortex radical, que forma un meristema y un primordio nodular.
4. El ingreso de los rizobios a los pelos radicales inducen la formación por parte de la planta de un tubo de composición similar a su pared celular conocido como canal de infección, el cual crece hacia el interior del pelo. Los rizobios dentro del canal crecen y se dividen, por lo que éste queda lleno de bacterias. El canal se ramifica a medida que crece hacia el interior del nódulo en desarrollo. Una vez que el canal de infección penetra la pared de las células epidérmicas, las bacterias se vierten al espacio intracelular (Schultze y Kondorosi, 1998).
5. Además del efecto directo de los NFs en los pelos radicales, éstos también inducen la reactivación del ciclo celular en la corteza y el periciclo de las raíces de la leguminosa. La activación del ciclo celular se extiende a través del cortex interno hasta formar el meristema nodular y el nódulo maduro. Las bacterias se liberan desde el canal de infección por endocitosis al citoplasma de las células vegetales en división (Gage, 2004).
6. En el interior celular los rizobios quedan separados del citoplasma por una membrana derivada de la planta hospedadora, la membrana peribacteroidal. Estos quedan rodeados individualmente o en pequeños grupos por la membrana peribacteroidal que engloba a uno o más bacteroides, constituyendo el simbiosoma. En esta etapa los rizobios se transforman en los bacteroides que adquieren la capacidad de fijar nitrógeno. Los bacteroides en varias leguminosas hospedadoras (ej. Arveja) se dividen dentro del simbiosoma y la membrana peribacteroidal se divide concomitantemente. En otras leguminosas (ej. *Phaseolus vulgaris* y *Glycine max*), los bacteroides se acumulan en grupos de 8 a 12 dentro del simbiosoma como resultado de la fusión de simbiosomas y de la continua división de los bacteroides (Brewin, 2004).

Dependiendo de la leguminosa se pueden distinguir dos tipos de nódulos: Determinados e indeterminados. Los nódulos indeterminados mantienen un meristema persistente y continúan creciendo durante todo su ciclo de vida, resultando en un gradiente de estados: una zona de diferenciación de bacteroides, una zona madura de fijación de N_2 y una zona de senescencia. Este tipo de nódulo presenta forma alargada y dependiendo de la leguminosa pueden ser bifurcados o no. Por otro lado, los nódulos determinados no mantienen un meristema activo, tienen forma esférica y una etapa de senescencia definida (Krishnan y Bennett, 2006).

1.1.5. Resultados de investigaciones

Sánchez (2010), reportó el aislamiento, identificación y selección de cepas de rizobios en *Leucaena leucocephala*. Las cepas de rizobios fueron aisladas de suelos con pH neutro (6,5 – 6,8), de baja fertilidad procedentes de los departamentos del Cesar y la Guajira - Colombia. Se obtuvieron 52 cepas de las cuales fueron seleccionados 12 morfotipos. Los aislamientos obtenidos presentaron las siguientes características: Formación de metabolitos ácidos y alcalinos, rápido a lento crecimiento, colonias de color blanca a transparente, convexas, de forma redonda a irregular, de borde liso con formación de moco. La eficiencia simbiótica de las cepas se midió a través de la técnica del ARA (Assay Reduction of Acetilen), donde se seleccionaron las cepas RG02 y RC02. Estas cepas fueron caracterizadas a través del gen 16S rRNA como *Rhizobium*.

Tang (1994), evaluó el efecto de la inoculación de *Leucaena leucocephala* cv. CNIA-250 con cuatro cepas de rizobios (IH-016, IH-1000, IH-1020 e IH-1024) provenientes de Cuba, Nigeria y Brasil. Se determinaron los parámetros agronómicos: Rendimiento de materia seca (MS), contenido de nitrógeno en la parte foliar y nodulación, empleando cilindros de PVC con suelo no disturbado y un diseño de bloques al azar con cinco réplicas. Las cepas IH-016 e IH-1020 produjeron rendimientos de MS (24,0 y 20,9 g/cilindro respectivamente) superiores a los del control sin inocular (14,7 g/cilindro) y presentaron abundante nodulación, predominante en la raíz principal y de coloración interna roja. Las cepas IH-1000 e IH-1024 mostraron bajos rendimientos, con incrementos de 8 y 10% respectivamente en el contenido total de N de la parte foliar en relación con el control no inoculado. Se observó disminución de la nodulación en el control nitrogenado.

Hernández *et al.*, (2012), reportaron el aislamiento de cepas nativas de *Rhizobium spp.*, a partir de nódulos de *Leucaena leucocephala*, en cultivos establecidos en el valle del Cesar, Colombia. Los nódulos obtenidos fueron desinfectados y enjuagados con agua destilada estéril. Se aislaron 11 cepas nativas de *Rhizobium spp.*, a las cuales se realizaron pruebas de identificación fisiológica en YMA + Azul de Bromotimol (AB) presentando la gran mayoría de cepas una reacción acida en el medio. Las colonias observadas fueron convexas con bordes regulares, de color lechoso y consistencia gelatinosa, algunas de ellas con abundante goma. Así mismo se observó mediante la tinción de Gram, bacilos Gram negativos, finos no esporulados. Se observó en general, crecimiento lento, encontrando crecimiento a los 3 días de incubación con colonias de menos de 2 mm de diámetro.

Bequer *et al.*, (2013), reportó el aislamiento y evaluación de la eficiencia simbiótica de cepas de rizobios en *Centrosema molle*, *Centrosema plumería* y *C. virginianum*. Los aislamientos se realizaron a partir de nódulos radicales de las leguminosas antes mencionadas procedentes del departamento de Santi Spiritus - Cuba. Se evaluó la eficiencia simbiótica de 41 cepas de rizobios teniendo en cuenta los siguientes parámetros: peso seco de la parte aérea de la planta (PSPAP), Peso seco de la raíz (PSR) e índice de nodulación (IN). Las cepas JK3 (*C. virginianum*), HG1 (*C. plumería*) y SP20 (*C. molle*) presentaron alto

índice de eficiencia simbiótica. Se concluye que la eficiencia simbiótica de las cepas de la zona centro de Sancti Spíritus fue alta o moderada cuando se inocularon en plantas de la misma zona; mientras que las de la zona sur fueron ineficientes. (Sprent, 2001) afirmó que los microsimbiontes con igual origen geográfico que sus macrosimbiontes pueden presentar mayor eficiencia simbiótica, debido probablemente a una coevolución leguminosa - rizobio.

Tang, *et al.*, (1992), estudiaron la respuesta de *Centrosema pubescens* CIAT- 438 a la inoculación con diferentes cepas de *Bradyrhizobium*, en condiciones de campo en un suelo Pardo Grisáceo, con un pH neutro (6,7). Se determinó el rendimiento de materia Seca (MS), el contenido de N de la parte foliar y la nodulación donde se obtuvieron de 50 a 100 nódulos por planta, de tamaños pequeños a grandes y todos en la raíz principal. *Centrosema pubescens* mostró buena respuesta a la inoculación con tres cepas de rizobio e incrementó de 38 a 91% el rendimiento de MS y de 50 a 94% el contenido de N con relación al control sin N y sin inocular. Su nodulación aumentó con la inoculación y fue abundante en las tres cepas, entre las que se destacó la cepa IH-1019 que mostró los mejores resultados.

Tang, Tamayo y Márquez (1982), reportaron la acción de siete cepas de *Rhizobium* sobre cuatro leguminosas (*Centrosema pubescens* cv. CNIA-08, *Stylosanthes guianensis* cv. CIAT-184, *Teramnus labialis* cv. Semilla Oscura y *Leucaena leucocephala* cv. Perú) en jarras de Leonard. En general, la aparición del primer nódulo ocurrió entre 19-22 días. *Centrosema pubescens* cv. CNIA-08 nodularon cuatro de las cepas probadas, de las cuales la IH-002 tuvo un rendimiento mayor (435,2 mg MS/planta) que el control sin N (111,3 mg MS/planta). La cepa IH-002 presentó además una nodulación más temprana (19 días), con un peso mayor en sus nódulos y en el contenido de nitrógeno (3,89%), en cambio la cepa IH-005 a pesar de poseer un buen porcentaje de N en la planta y peso de los nódulos (2,59 y 68,6 mg MS/planta, respectivamente) no presentó un buen rendimiento de MS (229,6 mg/planta). Según los autores, *Centrosema* es considerada una leguminosa que nodula un amplio rango de cepas, pero a menudo no de forma efectiva.

Leucaena leucocephala cv. Perú. La mayor cantidad de cepas nodularon en esta planta (5 de 7), pero al determinar el potencial de fijación de N el rendimiento alcanzado por estas fue similar al control sin N y menor que el control con N. Esta especie presenta alta especificidad en sus requerimientos de rizobios.

1.2. Definición de términos básicos

Diazótrofos: Son bacterias que hacen fijación de nitrógeno atmosférico en una forma más disponible como es el amonio (Postgate, 1998). Un diazótrofo es un organismo que es capaz de crecer sin fuentes externas de nitrógeno fijado. Ejemplos. de organismos que hacen esto son los *Bradyrhizobia*, *Frankia* (en simbiosis) y *Azospirillum* (en vida libre).

Nitrato: En la naturaleza, las plantas utilizan nitrato como elemento nutritivo esencial. En el comercio, la mayor parte del nitrato se usa en abonos inorgánicos. Nitrato y nitrito también se usan en la preservación de alimentos, en algunos medicamentos. Partiendo de nitrito se produce nitrato (NO_3^-).

Amonio: Radical químico cuya fórmula molecular es NH_4 . Se forma en el catabolismo de las proteínas, cuyos compuestos se parecen a los de los metales alcalinos. El cual está disponible para que lo capturen las raíces de las plantas

Procariotas: Son células pequeñas y muy simples, entre las que se encuentran los organismos unicelulares conocidos como bacterias. Los procariotas fueron los primeros seres vivos sobre la Tierra en el curso de la evolución: la edad de los hallazgos fósiles de estas células se estima en más de tres mil millones de años. Las células procariotas estructuralmente son las más simples y pequeñas. Como toda célula, están delimitadas por una membrana plasmática que contiene pliegues hacia el interior (invaginaciones) algunos de los cuales son denominados laminillas y otro es denominado mesosoma y está relacionado con la división de la célula (Bruce, 2006).

Filogenéticos: Un árbol filogenético es un diagrama que representa las relaciones evolutivas entre organismos. Los árboles filogenéticos son hipótesis, no hechos definitivos.

Nitrogenasa: Es la enzima responsable de la fijación de nitrógeno. A menudo, el crecimiento de las plantas está limitado por la cantidad de nitrógeno disponible en el suelo. Pequeñas cantidades de nitrógeno utilizables se forman por los rayos y la luz ultravioleta del sol. Se suministran cantidades significativas de nitrógeno a las plantas en forma de fertilizantes industriales. Pero la mayor parte del nitrógeno utilizable es creado por bacterias, usando la enzima nitrogenasa

Metaloproteínas: Las bacterias fijadoras de nitrógeno están equipadas con un complejo enzimático denominado nitrogenasa. La nitrogenasa es un enzima proteico, formado por dos metaloproteínas: la ferroproteína y la molibdoferroproteína. Esta enzima produce la catálisis de la reacción primordial de la fijación del nitrógeno, es decir, la transformación en amoníaco del nitrógeno presente en la atmósfera (Navarro y Navarro, 2013).

CAPÍTULO II

MATERIAL Y MÉTODOS

2.1. Sistema de hipótesis

H₀: El proceso de selección natural ante un estrés, como la degradación de suelos, no permite la adaptación de cepas de rizobios nativas superiores en la simbiosis fijadora de nitrógeno con leguminosas, por lo que no existen cepas de rizobios eficientes en la fijación biológica de nitrógeno con *Leucaena leucocephala* y *Centrosema macrocarpum*, provenientes de suelos de pasturas degradadas.

H_a: El proceso de selección natural ante un estrés, como la degradación de suelos, permite la adaptación de cepas de rizobios nativas superiores en la simbiosis fijadora de nitrógeno con leguminosas, por lo que existen cepas de rizobios eficientes en la fijación biológica de nitrógeno con *Leucaena leucocephala* y *Centrosema macrocarpum*, provenientes de suelos de pasturas degradadas.

2.2. Sistema de variables

Variable independiente (X):

Bacterias del género *Ensifer sp* y *Bradyrhizobium*

Variables dependientes (Y):

Altura de planta, Longitud de raíz, Peso fresco total, Peso seco total, Peso fresco de la raíz, Peso fresco de nódulos, Peso seco de nódulos, número de nódulos, número de nódulos en raíz principal, y Cantidad de nitrógeno total por planta.

Operacionalización de variables:

Operacionalización de Variables	
Variables dependientes	Altura de planta, Longitud de raíz, Peso fresco total, Peso seco total, Peso fresco de la raíz, Peso fresco de nódulos, Peso seco de nódulos, Numero de nódulos, Numero de nódulos en raíz principal y Cantidad de nitrógeno total por planta.
Variables independientes	Semillas de <i>Leucaena leucocephala</i> y <i>Centrosema macrocarpum</i> . Cepas de <i>Bradyrhizobium</i> y <i>Ensifer</i>

Fuente: Elaboración propia

2.3. Tipos de método de la investigación

2.3.1. De acuerdo a la orientación: Aplicada

2.3.2. De acuerdo a la técnica de contrastación: Descriptivo experimental

2.4. Diseño y análisis estadístico

El experimento para determinar la eficiencia simbiótica de *Rhizobium* de cepas aisladas e inoculadas en *Leucaena leucocephala* y *Centrosema macrocarpum* estuvo dispuesto como un diseño completamente aleatorizado (DCA) con 3 repeticiones (Figura 01). El trabajo contó con 18 tratamientos inoculadas con cepas de rizobios dos cepa control *Rhizobium leucaenae* y *Bradyrhizobium viridifuturi*, 2 controles nitrogenados no inoculado (100 y 50 mg N₂) y un control no inoculado y sin nitrógeno.

Diseño de bloques para *L. leucocephala*.

REPETICIÓN I	REPETICIÓN II	REPETICIÓN III
12	21	1
19	8	8
10	11	11
4	4	22
2	5	5
8	18	18
1	16	16
15	19	19
22	12	12
13	20	2
18	2	6
21	6	6
5	14	14
14	9	9
7	17	17
9	13	13
16	3	3
6	15	15
3	10	10
17	7	7
11	22	20
20	1	4

Diseño de bloques para *C. macrocarpum*

REPETICIÓN I	REPETICIÓN II	REPETICIÓN III
12	12	12
19	19	19
10	10	10
4	4	4
2	2	2
8	8	8
1	1	1
15	15	15
22	22	22
13	13	13
18	18	18
21	21	21
5	5	5
14	14	14
7	7	7
9	9	9
16	16	16
6	6	6
3	3	3
17	17	17
11	11	11
20	20	20

Figura 1: Ejemplo del experimento completamente aleatorizados (DCA) de 3 repeticiones y 22 tratamientos. Cada tratamiento se repite una vez dentro de cada repetición

2.5. Tratamientos estudiados

2.5.1. Tratamientos para *L. leucocephala*

N°	Tratamiento	Cepas	Código de aislamiento	Procedencia
1	T1	C-	Testigo Absoluto (no inoculado y sin nitrógeno)	
2	T2	C+NI	Testigo químico (50 mg N/jarra)	
3	T3	C+NII	Testigo químico (100 mg N/jarra)	
4	T4	CFN 299	Cepa control (<i>Rhizobium leucaenae</i>)	
5	T5	194	R1-006-03	Carañayacu-A
6	T6	195	R1-006-04	Carañayacu-A
7	T7	213	R1- 037-05	Estero-A
8	T8	215	R1-036-05	Estero-A
9	T9	198	R1-012-02	Estero-B
10	T10	201	R1-012-05	Estero-B
11	T11	226	R1-051-04	Cercado-A
12	T12	221	R1-045-02	Cercado-B
13	T13	222	R1-045-03	Cercado-B
14	T14	218	R1-041-03	Bosalao-A
15	T15	219	R1-041-04	Bosalao-A
16	T16	232	R1-057-05	Bosalao-B
17	T17	213	R1-036-03	Chacrilla
18	T18	207	R1-024-02	Chacrilla
19	T19	230A	R1-057-03-1	Bosalao B
20	T20	203	R1-018-02	Difuntillo
21	T21	205	R1-018-04	Difuntillo
22	T22	230B	R1-057-03-2	Bosalao B

2.5.2. Tratamientos para *C. macrocarpum*.

Nº	Tratamiento	Cepas	Código de aislamiento	Procedencia
1	T1	C-	Testigo Absoluto (no inoculado y sin nitrógeno)	
2	T2	C+NI	Testigo químico (50 mg N/jarra)	
3	T3	C+NII	Testigo químico (100 mg N/jarra)	
4	T4	BR1804	Cepa control (<i>Bradyrhizobium viridifuturi</i>)	
5	T5	148	Rcm-007-02	Estero B
6	T6	149	Rcm-007-04	Estero B
7	T7	142	Rcm-025-01	Carañayacu B
8	T8	166	Rcm-031-02	Estero A
9	T9	151	Rcm-015-01	Difuntillo
10	T10	155	Rcm-015-05	Difuntillo
11	T11	156	Rcm-020-01	Chacrilla
12	T12	159	Rcm-020-03	Chacrilla
13	T13	161	Rcm-026-02	Carañayacu B
14	T14	162	Rcm-026-03	Carañayacu B
15	T15	171	Rcm-037-02	Bosalao A
16	T16	174	Rcm-037-05	Bosalao A
17	T17	175	Rcm-047-02	Cercado B
18	T18	176	Rcm-047-03	Cercado B
19	T19	178	Rcm-052-01	Cercado A
20	T20	179	Rcm-052-02	Cercado A
21	T21	177	Rcm-047-04	Cercado B
22	T22	186	Rcm-058-05	Bosalao B

2.6. Ubicación del experimento

El trabajo de investigación se llevó a cabo en dos lugares:

- La recolección de suelos de pasturas degradadas se realizó en 10 zonas representativas del distrito de Cuñumbuque.
- Las fases de aislamiento, purificación, caracterización y autenticación de las cepas nativas de rizobios se realizó en el Laboratorio de Microbiología Agrícola, FCA - UNSM - T.

La evaluación de la eficiencia simbiótica se llevó a cabo en el invernadero del laboratorio de Microbiología Agrícola, FCA – UNSM - T.

El laboratorio e invernadero se encuentran ubicados en la ciudad universitaria, Distrito de Morales, Provincia de San Martín, Región de San Martín

2.7. Metodología

2.7.1. Conducción del experimento

a. Colecta de muestras de suelos para análisis fisicoquímico y biológico y ensayo de plantas trampa

Ubicación de la zona de muestreo

Las muestras de suelo fueron colectadas de suelos de pasturas del distrito de Cuñumbuque, departamento de San Martín; ubicado a 330 msnm. Se seleccionaron 10 suelos de fundos ganaderos del distrito de Cuñumbuque, en parcelas de 10 000 m², los mismos que fueron seleccionados por el nivel de degradación de sus pasturas. Las zonas donde se realizaron los muestreos fueron: Carañayacu (CARA), Bosalao (BOSA), Estero (ESTE), Chacrilla (CHACRI), Difuntillo (DIFUN) y cercado de Cuñumbuque (CERCA).

Colecta de muestras de suelo

La colecta de suelos se llevó a cabo usando la metodología sugerida por Dionisio y Pimentel (2016). Cada lugar fue identificado y se procedió a determinar los puntos de ubicación mediante GPS, posteriormente se colectaron las muestras de suelo de cada zona en estudio. Para los análisis físico-químico y biológico del suelo se colectaron muestras desde 0 - 20 cm (Figura 2 y 3).



Figura 2: Muestreo de primeros 20 cm de superficie de suelo



Figura 3: Muestreo adecuado de suelo para análisis microbiológicos

El muestreo se ejecutó en forma de zigzag donde se tomaron 10 puntos equidistantes (aproximadamente a 20 m). En cada punto se colectó 1kg de suelo, luego se realizó un compósito donde posteriormente fue homogenizado, y se tomó 1 Kg de muestra representativa. Las muestras fueron empacadas en bolsas de polipropileno (10 x 12 cm), rotuladas y luego almacenadas en un cooler con hielo hasta su llegada al laboratorio, donde las muestras para análisis biológicos fueron colocadas a 4°C, hasta su posterior análisis (Dionisio y Pimentel, 2016). Además de cada lugar de muestreo se colectaron 20 kilos de suelo por cada punto de muestreo, este sirvió para el ensayo de plantas trampa donde los microorganismos presentes en el suelo fueron capturados mediante la siembra de *L. leucocephala* y *C. macrocarpum*

b. Tratamiento del suelo e instalación de plantas trampa

Esta actividad se realizó de acuerdo a la metodología sugerida por Moreira *et al.*, (2016).

Tratamiento de los suelos

El suelo colectado de cada zona de estudio fue llevado al almacén de suelos en sacos de polipropileno. Procediendo de la siguiente forma:

Cada saco fue abierto y se dejó a temperatura ambiente (orear) hasta alcanzar una humedad adecuada.



Figura 4: Suelo expuesto a temperatura ambiente para su secado

Inmediatamente cada suelo (figura 4) fue escogido, retirando restos de plantas, raíces o materia vegetal en descomposición, piedras u otro material físico.



Figura 5: Separación de restos vegetales del suelo recolectado

Los suelos fueron triturados, tamizados y almacenados en sacos de polipropileno, para su posterior uso. De acuerdo a los análisis fisicoquímicos de los suelos, se realizó las correcciones necesarias para un correcto desarrollo de las plantas.

Instalación de plantas trampa:

Se utilizó muestras de 10 Suelos y 2 leguminosas forrajeras de *L. leucocephala*. *C. macrocarpum*. por 3 repeticiones. Haciendo un total de 60 plantas trampa, estas fueron codificados de acuerdo a la siguiente leyenda.

CARA-A, CARA-B, BOSA-A, BOSA-B, ESTE-A, ESTE-B, CERCA-A, CERCA-B, DIFUN y CHACRI.

CARA: Carañayacu

BOSA: Bosalao
ESTE: Estero
CERCA: Cercado de Cuñumbuque
DIFUN: Difuntillo
CHACRI: Chacrilla
A y B: Lugares de muestreo.

Para evitar la compactación de los suelos, se procedió a preparar la siguiente mezcla: Suelo Vermiculita esterilizada (1:1) volumen/volumen (figura 6). La vermiculita fue esterilizada a 121 °C durante 60 minutos (Rodríguez *et al.*, 2000).



Figura 6: Sustrato suelo proveniente de campo y vermiculita proporción 1:1 volumen.

Para las plantas de *L. leucocephala* y *C. macrocarpum* se utilizaron macetas de 5 kg se colocó un disco de papel filtro del tamaño de la base en el fondo de la maceta, para evitar la pérdida de suelo y mantener las macetas a capacidad de campo.

Para mantener las macetas a capacidad de campo, se empleó las macetas con el suelo, y se regaron a lo largo del día usando agua destilada, hasta la saturación. El riego se realizó cada vez que se requería. Cada lote de semilla de leguminosa, fue evaluado de acuerdo a su porcentaje de germinación. De acuerdo a ello las semillas fueron desinfectadas, enjuagadas y sembradas en macetas en número de 6 semillas por maceta.

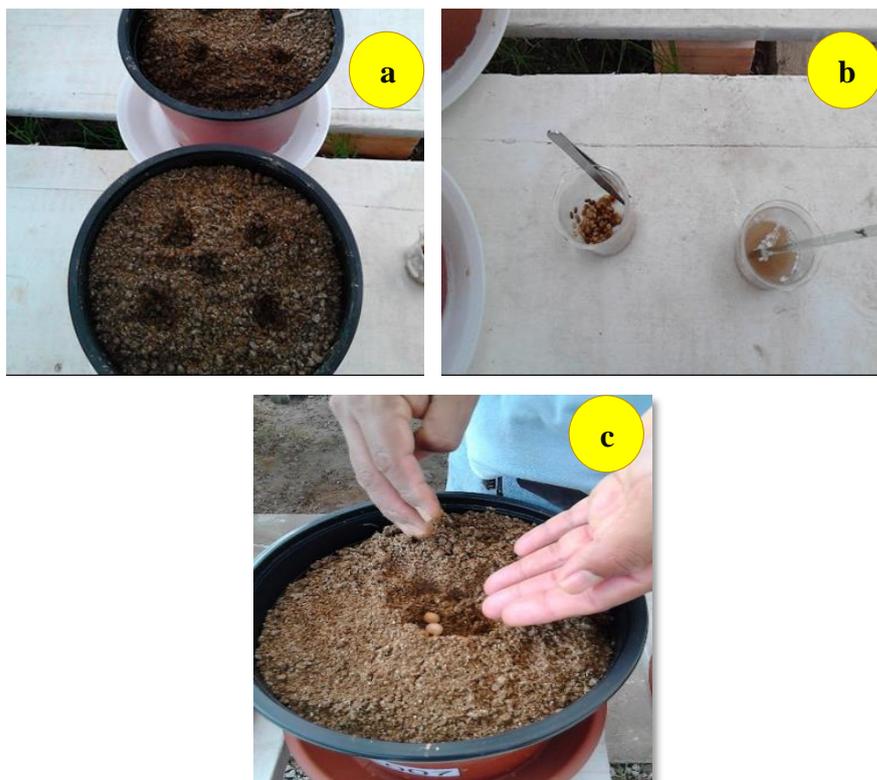


Figura 7: Desinfección y siembra de semillas de *L. leucocephala* y *C. macrocarpum* a) Alturas de hoyos, b) Desinfección de semillas con hipoclorito de sodio 3%, c) Siembra de semillas.

Después de una semana, las plántulas germinadas fueron raleadas y se dejó solo tres plantas por maceta (figura 8). Las macetas se mantuvieron por espacio de 60 días, hasta el momento de la cosecha.



Figura 8: a) Plántulas germinadas de *C. macrocarpum* a 7 días después de la siembra. b) Plántulas de *L. leucocephala* a 8 días después de la siembra

c. Cosecha y colecta de nódulos

A los 60 días después de la siembra (figura 9, 10) las plantas fueron cosechadas, para lo cual se lavaron las raíces con agua uniforme a fin de evitar el desprendimiento de nódulos durante la extracción. Luego se procedió a examinar el sistema radicular en cuanto a la formación o no de nódulos (figura 11 y 12). Se registró el número de nódulos y fueron desinfectados para su análisis.



Figura 9: Plantas de *C. macrocarpum* a 60 días después de la siembra



Figura 10: Macetas de 5 kg conteniendo plantas de *L. leucocephala* a 60 días después de la siembra.

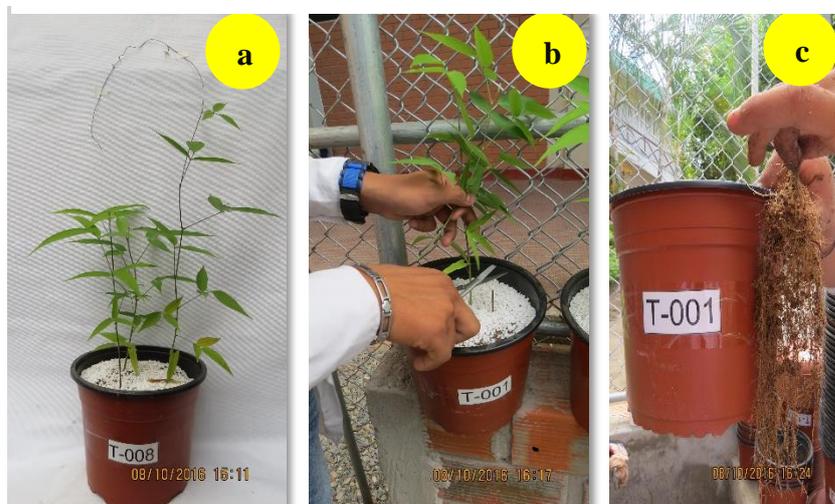


Figura 11: a) planta de *C. macrocarpum* apta para la obtención de nódulos
b) Retiro de la parte foliar de la planta. c) Obtención de masa radicular y nódulos



Figura 12: a) Almacenamiento de raíces y nódulos en bolsa de polipropileno. b) Raíz libre de suelo, lista para obtener nódulos. c) Obtención de nódulos fisiológicamente activos

d. Aislamiento, purificación y conservación de cepas de rizobios

Se siguió la metodología sugerida por (Valdez *et al.*, 2016). Los nódulos fueron lavados en agua destilada y luego esterilizados superficialmente en alcohol al 70% por 1 minuto, después con hipoclorito de sodio al 3,5% por 5 minutos, luego se realizaron 6 enjuagues con agua destilada estéril de acuerdo al tipo de nódulo. La eficiencia en la desinfección superficial de los nódulos, fue evaluada mediante el plaqueado de 30 μ L del agua del último enjuague. Realizada la desinfección, los nódulos fueron triturados y el extracto fue estriado en placas conteniendo Agar Extracto de Levadura Manitol suplementado con rojo de Congo (25 μ g ml⁻¹) (YEM) descrito por Vincent (1970) y Beck *et al.*, (1993). El crecimiento se verificó a partir del segundo día y estos fueron rizobios de rápido crecimiento (RC) y/o rizobios de lento crecimiento (LC), (Somasegaran y Hoben, 1994).

Se seleccionaron todas las colonias individuales que crecieron en las placas y se procedió a su purificación en Agar YEM. Las colonias individuales fueron reestriadas 3 o 4 veces hasta observar crecimiento homogéneo, momento en que se considera que la cepa es pura (Hungría, 1994). Cada aislamiento fue conservado de dos maneras: En Medio (YEM) inclinado como cultivo de trabajo a corto plazo y a modo de largo plazo fue conservado en crioviales usando glicerol al 10% y almacenado a - 20°C (Somasegaran y Hoben, 1994).



Figura 13: Nódulos en raíz de *L. leucocephala*

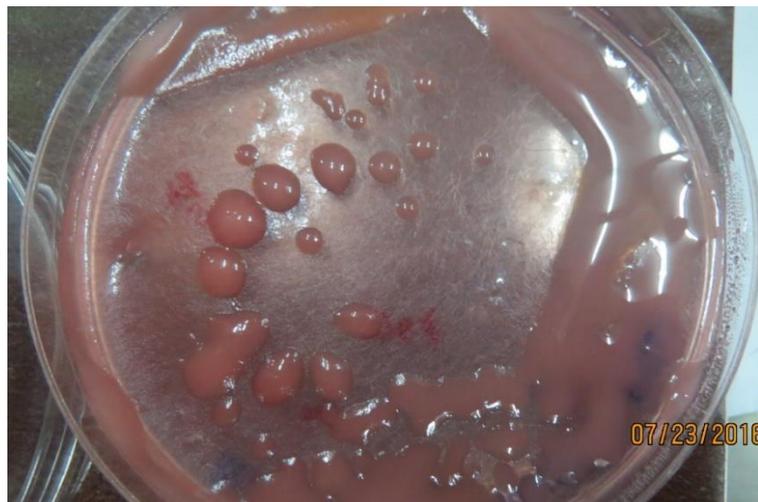


Figura 14: Aislamiento de bacterias diazotroficas obtenidos de los nódulos de *L. leucocephala*

e. Autenticación de cepas de rizobios

Se siguió la metodología sugerida por Somasegaran y Hoben (1994).

Todas las cepas purificadas fueron sembradas en tubos con medio YEM líquido e incubadas a 28 °C hasta alcanzar una densidad óptica (DO) de 1,0. Al mismo tiempo, semillas de *L. leucocephala* y *C. macrocarpum* fueron desinfectadas, puestas a germinación, sembradas en bolsas de polipropileno de (10 x 20 cm) de crecimiento e incubadas a 25 - 30 °C por 30 días.

Las plantas se regarán con solución libre de nitrógeno cada semana. Durante la evaluación se realizarán observaciones diarias a partir del décimo día después de la inoculación. Se registró los resultados obtenidos acerca de cuáles de las cepas probadas fueron capaces de inducir nodulación positiva; se anotó el color interior de los nódulos.

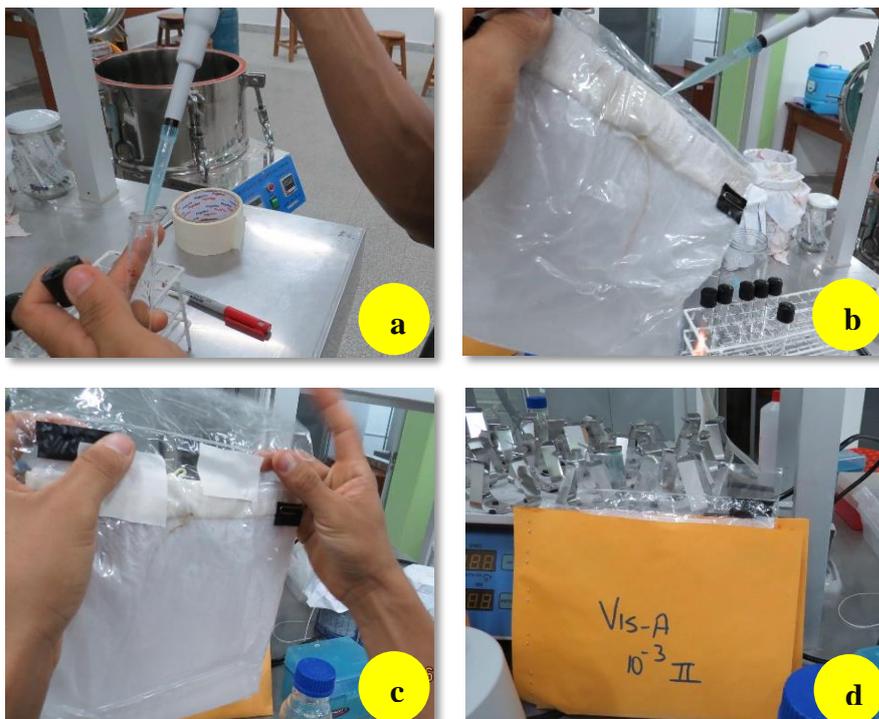


Figura 15: a) y b) Inoculación de suelo diluido en semillas de *L. Leucaena* y *C. macrocarpum*

f. Caracterización de cepas de rizobios

El estudio de las características, morfocoloniales de las cepas (forma, tamaño, color y textura de las colonias) se realizó mediante la siembra de cada aislado en medio YEM (pH 6,8) y se incubaron por 10 días a 28°C. Las características morfocoloniales fueron reportadas usando un estereoscopio (Pérez, *et al.*, 2008).

La producción de metabolitos ácidos o alcalinos se evaluó mediante el cultivo de cada uno de los aislados en medio YEM (pH 6,8) con indicador Azul de Bromotimol (0,5% en NaOH 0,016N) incubados a 28°C, durante diez días, según la tasa de crecimiento de cada una de las cepas. Una vez concluido el crecimiento se observó el cambio de coloración en el medio (Somasegaran y Hoben, 1994; Sosa *et al.*, 2004).

g. Evaluación de la eficiencia simbiótica

Se siguió la metodología sugerida por Somasegaran y Hoben (1994). La eficiencia simbiótica de las cepas de Rizobios aisladas de *L. leucocephala* y *C. macrocarpum* fue evaluada bajo condiciones de invernadero. Las semillas fueron inoculadas con 1ml de medio YEM a una DO 600 nm 1,0, correspondiente a cada cepa y luego se sembraron 5 semillas por maceta, luego de la germinación las plantas fueron raleadas a dos plantas por maceta. Las plantas se mantuvieron durante 60 días

y finalizado el tiempo se evaluó alturas de planta para *L. leucocephala*. y *C. macrocarpum*, longitud de la raíz, peso fresco total (mg), peso seco total, peso fresco de la raíz (PFR), peso fresco de nódulos (PFN), peso seco de nódulos (PSN), número de nódulos (NN), número de nódulos en raíz principal (NNRP), cantidad de Nitrógeno total (NT) por planta en (mg).

Las plantas se secaron a 70 C° hasta quedar en peso constante (Bécquer, 2013). Se usaron cuatro controles, dos controles nitrogenados de acuerdo a las dosis requeridas por las leguminosas, y un control blanco sin inoculación y sin nitrógeno, y una cepa patrón para cada leguminosa.

Una cepa de rizobios fue considerada eficiente cuando los valores medios de PSPA y cantidad de nitrógeno acumulada en las plantas inoculadas sean superiores a los obtenidos en plantas sin inoculación. La eficiencia y eficacia fueron calculadas usando las siguientes fórmulas:

$$\begin{aligned} \text{Eficiencia} &= (\text{PSPA tratamiento/PSPA testigo -N}) \times 100 \\ \text{Eficacia} &= (\text{PSPA tratamiento/PSPA testigo +N}) \times 100 \end{aligned}$$

2.5. Población y muestra

2.5.1. Población

La población fue constituida por microorganismos totales presentes en suelos de pasturas degradadas de fundos ganaderos del distrito de Cuñumbuque, localidades de Carañayacu, Bosalao, Estero, Chacrilla, Difuntillo y cercado de Cuñumbuque, en parcelas de 10 000 m².

2.5.2. Muestra

Lo constituyeron Bacterias del género *Ensifer* y *Bradyrhizobium* asociados a dos leguminosas *Leucaena leucocephala* y *Centrosema macrocarpum* aisladas en el laboratorio.

Análisis estadístico

El análisis de los datos se realizó empleando el programa estadístico INFOSTAT. Los datos estuvieron sujetos al análisis de varianza (ANOVA) al 0,05 de significancia y se evidenciará diferencia significativa usando la prueba de LSD-Fisher.

CAPÍTULO III

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Descripción fenotípica de las cepas aisladas

En la tabla 1 y 2 se presenta la descripción de las cepas obtenidas a partir de leguminosas como *Leucaena leucocephala* y *Centrosema macrocarpum* en el Distrito de Cuñumbuque, en los medios de cultivo – LMA y LMA con azul de Bromotimol.

Tabla 1
Características Morfocoloniales de cepas de L. leucocephala

Características Morfocoloniales de las Cepas								
CEPAS	FAA	CC	DO	EL	FC	BC	FM	EM
194	AC	BL	B	P	R	L	P	AH
195	AC	BL	B	P	R	L	P	AH
213	AC	BL	B	P	R	L	P	AH
215	AC	BL	O	P	R	L	A	AH
198	AC	BL	B	P	R	L	P	AH
201	AC	BL	B	P	R	L	P	AH
226	AC	BL	B	P	R	L	P	AH
221	AC	BL	B	P	R	L	P	AH
222	AC	BL	B	P	R	L	P	AH
218	AC	BL	B	P	R	L	P	AH
219	AC	BL	B	P	R	L	P	AH
232	AC	BL	B	P	R	L	P	AH
206	AC	BL	B	P	R	L	P	AH
207	AC	BL	B	P	R	L	P	AH
230A	AC	BL	B	P	R	L	P	AH
203	AC	BL	O	P	R	L	P	AH
205	AC	C	B	P	R	L	P	AH
230B	AC	C	B	P	R	L	P	AH

FAA: Formación de ácido-álcali (AC: acidífica, AL: alcalinización, N: neutro).

CC: color de colonia (T: transparente, BL: blanco Lechoso, C: crema).

DO: detalle óptico (TR: translúcido, O: opaca, B: brillante).

EL: Elevación (P: plana, C: convexa, Co: cóncava).

FC: Forma Colonia (R: Redonda, I: irregular, P: puntiforme).

BC: borde de la colonia: (L: liso, R: rugoso, E: entero, D: dentado, O: ondulado, F: filamentoso, L: lobulado).

FM: Formación de moco (P: presente, A: ausente).

EM: Elasticidad del Moco (AH: Ausencia de Hilo, pH: presencia de hilo).

Las cepas aisladas de *L. leucocephala* del Distrito de Cuñumbuque (tabla 1), después de la incubación en medio LMA suplementado con azul de bromotimol presentaron una reacción acida (AC) a la formación de ácido-álcali. La acidificación del medio de cultivo puede estar relacionado con la capacidad de estos microorganismos de utilizar azúcares como el manitol como fuente de carbono promoviendo la acidificación del medio por la excreción de ácidos (Morales, 1992) mencionado por (Sánchez, 2010). Lo relacionado con el color de la colonia (CC) las cepas que presentaron un color blanco lechoso (BL) son 194, 195, 213, 215, 198, 201, 226, 221, 222, 218, 219, 232, 206, 207, 230A, 203 y solo dos 205, 230B presentaron un color crema (C). En el detalle óptico (DO) en su gran mayoría presentaron un DO brillante esto se presentó en las cepas 194, 195, 213, 198, 201, 226, 221, 222, 218, 219, 232, 206, 207, 230 y las de color opaco (O) son 215, 203 respectivamente. Todas presentaron una elevación (EL) plana (P), Forma de colonia (FC) todos fueron redondas (R), Borde de la colonia (BC) todas presentaron una forma Liso (L), Formación de moco (FM) se presentó en las cepas 194, 195, 213, 198, 201, 226, 221, 222, 218, 219, 232, 206, 207, 230A, 203, 205, 230B y en la cepa 215 estuvo ausente, la ausencia de moco en el medio de cultivo puede ser una característica que favorezca la fijación simbiótica de nitrógeno y esto se vio reflejado en la prueba de reducción de acetileno (Sánchez, 2010). Elasticidad del Moco (EM) todas tuvieron una ausencia de hilo (AH).

Tabla 2
Características Morfocoloniales de cepas de *C. macrocarpum*

Características morfocoloniales de las cepas								
CEPAS	FAA	CC	DO	EL	FC	BC	FM	EM
148	AL	BL	O	P	R	L	P	AH
149	AL	BL	B	P	R	L	P	AH
142	AL	BL	B	C	R	L	P	AH
166	AL	BL	B	P	R	L	A	AH
151	AL	BL	B	P	R	L	P	AH
155	AL	BL	B	C	R	L	P	AH
156	AL	BL	B	C	R	L	P	AH
159	AL	BL	O	P	R	L	A	AH
161	AL	BL	B	C	R	L	P	AH
162	AL	BL	B	P	R	L	P	AH
171	AL	T	B	C	R	L	P	AH
174	AL	BL	B	P	R	L	P	AH
175	AL	BL	B	P	R	L	P	AH
176	AL	C	O	P	R	L	A	AH
178	AL	BL	O	P	R	L	A	AH
179	AL	BL	B	C	R	L	P	AH
177	AL	BL	B	C	R	L	P	PH
186	AL	BL	B	P	R	L	P	AH

FAA: Formación de ácido-álcali (AC: acidifica, AL: alcalinización, N: neutro).

CC: color de colonia (T: transparente, BL: blanco Lechoso, C: crema).

DO: detalle óptico (TR: translúcido, O: opaca, B: brillante).

EL: Elevación (P: plana, C: convexa, Co: cóncava).

FC: Forma Colonia (R: Redonda, I: irregular, P: punctiforme).

BC: borde de la colonia: (L: liso, R: rugoso, E: entero, D: dentado, O: ondulado, F: filamentosos, L: lobulado).

FM: Formación de moco (P: presente, A: ausente).

EM: Elasticidad del Moco (AH: Ausencia de Hilo, PH: presencia de hilo).

Las cepas aisladas de cepas de *C. macrocarpum* del Distrito de Cuñumbuque (tabla 2), para la Formación de ácido álcali todas las cepas 148, 149, 142, 166, 151, 155, 156, 159, 161, 162, 171, 174, 175, 176, 178, 179, 177, 186 presentaron una reacción alcalinización (AL); datos diferentes encontrados por Hernández *et al.*, (2012) quien manifiesta que las cepas aisladas de *C. macrocarpum* presentaron reacción acida en el medio.

Color de la colonia las cepas 148, 149, 142, 166, 151, 155, 156, 159, 161, 162, 174, 175, 178, 179, 177, 186 presentaron una respuesta de color blanco lechoso (BL), la cepa 171 presento una coloración transparente (T), la cepa 176 mostró una coloración crema; colores similares encontrados por Hernandez *et al.*, (2012) quien también reporto aislados de color lechoso.

El detalle óptico (DO) la cepa 148 mostro una coloración opaca (O), las cepas 149, 142, 166, 151, 155, 156, 161, 162, 171, 174, 175, 179, 177, 186 presentaron una coloración brillante (B). La elevación (EL) plana (P) que muestran las cepas son las 148, 149, 166, 151, 159, 162, 174, 175, 176, 178, 186, las cepas con elevación circular (C) son 142, 155, 156, 161, 171, 179, 177.

Para forma de la colonia (FC) todas presentaron una forma redonda (R). En cuanto para borde de la colonia (BC) todas las cepas presentaron un borde liso (L). Relacionado a la formación del moco (FM) estas son las cepas 148, 149, 142, 151, 155, 156, 161, 162, 171, 174, 175, 179, 177, 186 que está presente (P), y en las que se encuentra ausente (A) 166, 159, 176, 178 y para Elasticidad del Moco (EM) en todas hay una ausencia de hilo (AH) a excepción de la cepa 177 que existe presencia se Hilo (PH).

3.1. Altura de planta alcanzadas para *L. leucocephala* y *C. macrocarpum*

En la tabla 3, se presentan los análisis de varianza para la altura alcanzada por *L. leucocephala* y *C. macrocarpum* el cual muestra altas significancias estadísticas a un $p < 0,05$ (95%) para la fuente de variabilidad Tratamientos, determinándose la existencia de un grado de asociación entre las variables de estudio. Así mismo el coeficiente de variabilidad (cv) para *L. leucocephala* y *C. macrocarpum* fueron de 22 % y 10,19%, el coeficiente de determinación R^2 fue de 74 % y 88% para ambas especies evaluadas, lo que nos indica que el porcentaje del ajuste (porcentaje de la variación) que se ha conseguido se explica muy bien a través del modelo lineal estimado.

Tabla 3

ANVA para alturas (cm) alcanzadas para *L. leucocephala*. y *C. macrocarpum* (transformado V_x)

Fuentes de variabilidad	G.L	<i>L. leucocephala</i>			G.L	<i>C. macrocarpum</i>		
		S.C.	P-valor	Sig.		S.C.	P-valor	Sig.
Tratamientos	23	2611,62	0,001	**	21	5,59	0,001	**
Error exp.	72	919,56			44	0,78		
Total	95	3531,18			65	6,37		

C.V. = 22. % $R^2 = 74 \%$

C.V. = 10,19% $R^2 = 88\%$

**Altamente significativo (P<0,05)

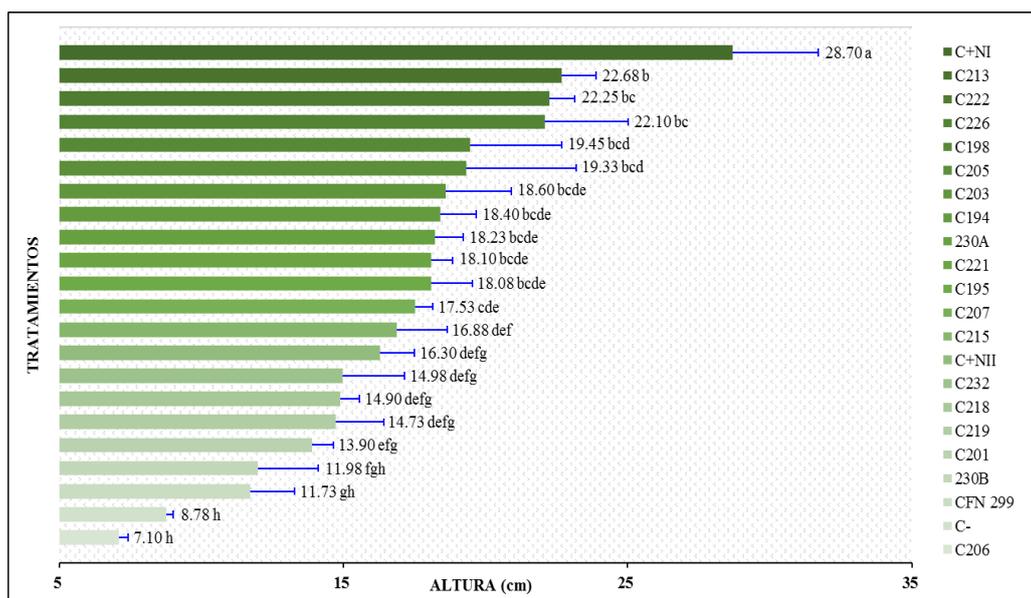


Figura 16: Prueba de Fisher (P<0,05) para los promedios de altura en *L. leucocephala* a 80 dds

En el análisis de comparación de medias según el test de LSD - Fisher, $p < 0.05$ (Figura:16), para *L. leucocephala* el tratamiento que obtuvo mayor promedio es el suplementado con 200 mg N o (C+ NI) testigo, obtuvo el mayor promedio con 28,70 cm de altura de planta, siendo estadísticamente diferente a los demás tratamientos estudiados es decir superando estadísticamente a los tratamientos. El tratamiento C213 obtuvo un promedio 22,68 cm de altura el cual es estadísticamente igual al tratamiento C222 quien obtuvo una altura de 22,65 cm. Datos diferentes encontrados por Moreno, (2010) quien manifiesta que las plantas inoculadas con rizobios tienden a tener mayor capacidad fotosintética expresada en el área foliar y altura de planta con respecto a las plantas no inoculadas.

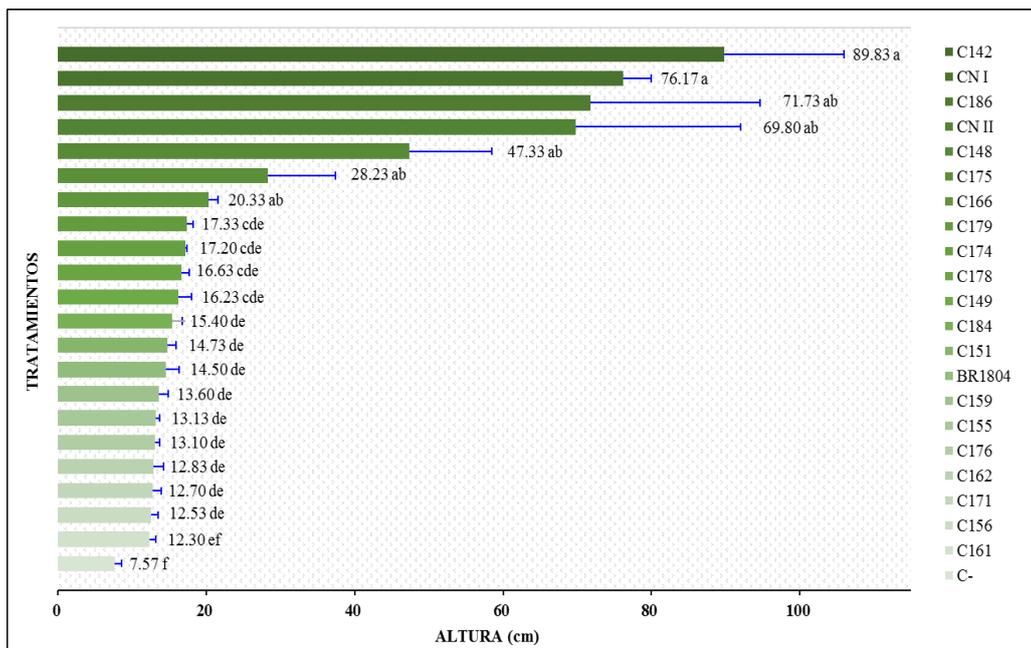


Figura 17: Prueba de Fisher ($P < 0,05$) para los promedios de altura en *C. macrocarpum* a 60 dds

En el análisis de comparación de medias según el test de LSD-Fisher, $p < 0,05$ (Figura 17), para *C. macrocarpum*, nos muestra que el tratamiento C142 obtuvo el mayor promedio con 98,93 cm, siendo estadísticamente igual al tratamiento CNI (Testigo) quien obtuvo promedio de 76,17 cm de altura de planta y a la vez muestra un comportamiento semejante con los tratamientos C186, CNII, C148, C175, C166 respectivamente, los resultados encontrados son superiores a los encontrados por Sosa *et al.*, (2010) donde encontro una altura de 23 cm, en la cual señala que, debido tal vez a que la especie requiera de bacterias más específicas para formar nódulos y fijar nitrógeno atmosférico, pero su tratamiento testigo el cual estaba fertilizado presentó los mayores valores con 35 cm de altura.

3.2. Longitud de la raíz

En la (tabla 4), se presentan los análisis de varianza para la Longitud de la raíz por *L. leucocephala* y *C. macrocarpum*, el cual nos muestra diferencias significativas a un $p < 0,05$ (95%) para la fuente de variabilidad Tratamientos, debido a que los valores de la probabilidad (p-valor) fue menor que el nivel de riesgo de $\alpha = 0,05$ y mayor que el nivel de riesgo $\alpha = 0,01$ lo cual determina así la existencia de un grado de agrupación entre las variables de estudio.

Tabla 4

ANVA para longitud de la raíz (cm) alcanzadas para para *L. leucocephala* y *C. macrocarpum* (transformado Vx)

Fuentes de variabilidad	G.L	<i>L. leucocephala</i>			G. L	<i>C. macrocarpum</i>		
		S.C.	P-valor	Sig.		S.C.	P-valor	Sig.
Tratamientos	23	82,47	0,0025	*	21	0,69	0,0011	*
Error exp.	72	107,26			44	0,48		
Total	95	198,73			65	1,17		

C.V. = 14,7% $R^2 = 43\%$

C.V. = 5,93% $R^2 = 59\%$

*Significativo ($P < 0,05$)

Del mismo modo observamos que el Coeficiente de Variabilidad (C.V.) para la especie *L. leucocephala* fue de 14,7%, y para *C. macrocarpum* es 5,93% el cual se encuentra dentro de la variabilidad aceptada en trabajos de investigación de esta naturaleza. Por otro lado, el efecto determinado por los tratamientos estudiados sobre la longitud de la raíz (variable predictora) fue determinado por el Coeficiente de Determinación (R^2) en 43% para la especie *L. leucocephala* y para *C. macrocarpum*, obtuvo un $R^2 = 59\%$, lo que nos indica que el porcentaje del ajuste (porcentaje de la variación) que se ha conseguido está por debajo del mínimo permisible, lo que se constituye en una variable que no explicó suficientemente los resultados a través del modelo lineal estimado. Lo que da a entender que con la variable evaluada se obtuvo una baja predicción de la varianza explicada sobre la varianza no explicada (error experimental), por encontrarse muy por debajo del 70%.

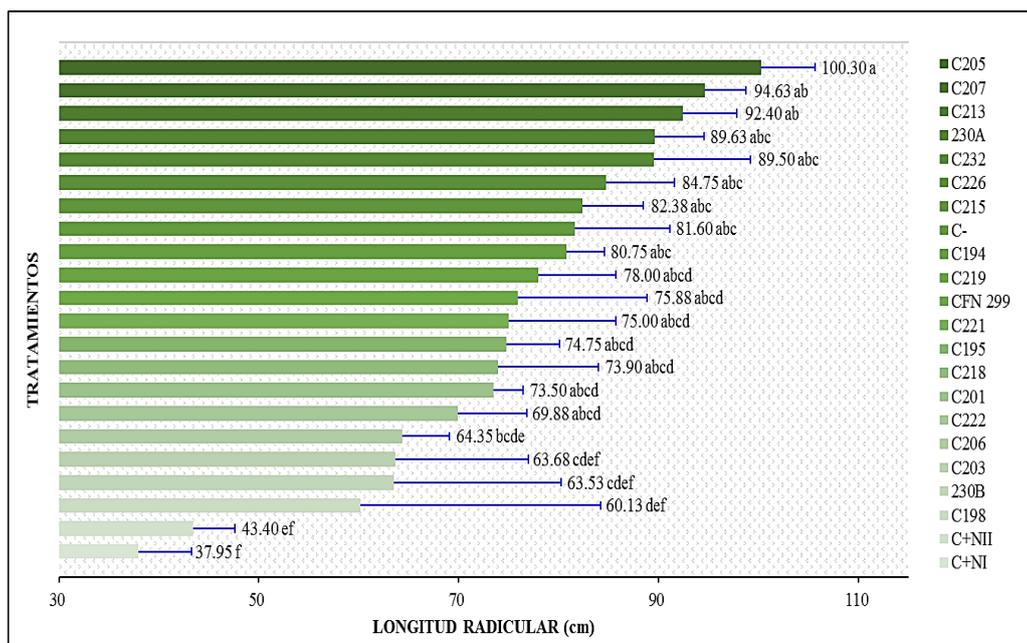


Figura 18: Prueba de Fisher ($P < 0,05$) para Longitud de raíz en *L. leucocephala*

La prueba de Fisher ($P < 0,05$) para Longitud de raíz en *L. leucocephala* (Figura 18) nos muestra que con el Tratamiento C205 obtuvo el mayor promedio con 100,30 cm de longitud radicular, siendo estadísticamente igual al C207 quien obtuvo promedio de 94,63 cm de altura de planta, y este a su vez muestra un comportamiento semejante a C213 con un valor de 92,40 cm. Pero estos tratamientos mencionados son iguales estadísticamente al testigo C- con un valor de 81,60 cm y también testigo CFN 299 quien logro una longitud de raíz de 75,88 cm. Los tratamientos testigos C+NII y C+NI fueron superados por todos los demás tratamientos. En un estudio realizado por Pomarsol, (2014) encontró un valor máximo de 37,8 cm de longitud radicular y concluyen que la abundante emisión de raíces secundarias demuestra alta calidad y garantiza un rápido crecimiento después de la plantación; cuando se establece en condiciones ambientales favorables para su crecimiento, emite nuevas raíces, las cuales iniciarán el proceso de absorción de agua.

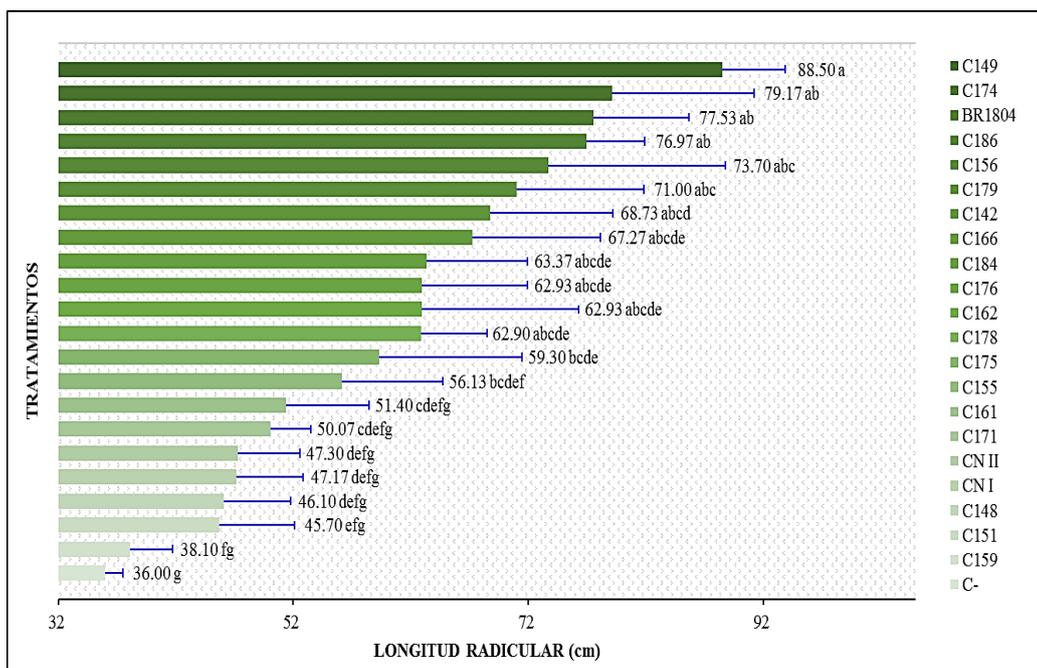


Figura 19: Prueba de Fisher ($P < 0,05$) para longitud de la raíz en *C. macrocarpum*

La prueba de Fisher ($P < 0,05$) para Longitud de raíz en *C. macrocarpum* (Figura 19) nos muestra que el tratamiento C149 que obtuvo la mayor longitud de raíz 88,50 cm el cual es igual estadísticamente a C174, BR1804 77,53 cm (Testigo), C186, C156, C179, C142, C166, C184, C176, C162, C178, los cuales muestran promedios iguales pero que superaron a los valores obtenidos por los tratamientos testigo CNII, CNI, la menor longitud radicular fue de C- con un valor de 36 cm. Los rizobios pueden influir de forma positiva en el desarrollo de las plantas, no solo a través de la fijación de nitrógeno, sino también de la producción de sustancias estimuladoras del crecimiento vegetal, las cuales pueden actuar en las diferentes partes vegetales Avis *et al.*, (2008) mencionado por Bécquer *et al.*, (2013). Independientemente del efecto de la fijación de nitrógeno en la parte aérea de la planta, no se descarta que en esos tratamientos

existiera una mayor absorción de nutrientes, fácilmente asimilables a través del sistema radical.

3.3 Peso fresco total (mg)

En la (tabla 5), se presentan los análisis de varianza para peso fresco total (mg) alcanzado por *L. leucocephala* y *C. macrocarpum* el cual muestra altas significancias estadísticas a un $p < 0,05$ (95%) para la fuente de variabilidad Tratamientos, determinándose la existencia de un grado de relación entre las variables de estudio. Así mismo el coeficiente de variabilidad (cv) para *L. leucocephala* y *C. macrocarpum* fueron de 12,64% y 9,06%, el coeficiente de determinación R^2 fue de 66 % y 68% para ambas especies evaluadas, lo que nos indica que el porcentaje del ajuste (porcentaje de la variación) que se ha conseguido está por debajo del mínimo permisible, lo que se constituye en una variable que no explicó suficientemente los resultados a través del modelo lineal estimado.

Tabla 5

ANVA para peso fresco total (mg) alcanzadas para *L. leucocephala* y *C. macrocarpum* (transformado Vx)

Fuentes de variabilidad	G.L	<i>L. leucocephala</i>			<i>C. macrocarpum</i>			
		S.C.	P-valor	Sig.	G.L	S.C.	P-valor	Sig.
Tratamientos	23	3,04	0,001	**	21	6,40	0,0001	**
Error exp.	48	1,58			44	3,07		
Total	71	4.62			65	9,48		
		C.V. = 12.64%	$R^2 = 66\%$		C.V. = 9.06%	$R^2 = 68\%$		

**Altamente significativo ($P < 0,05$)

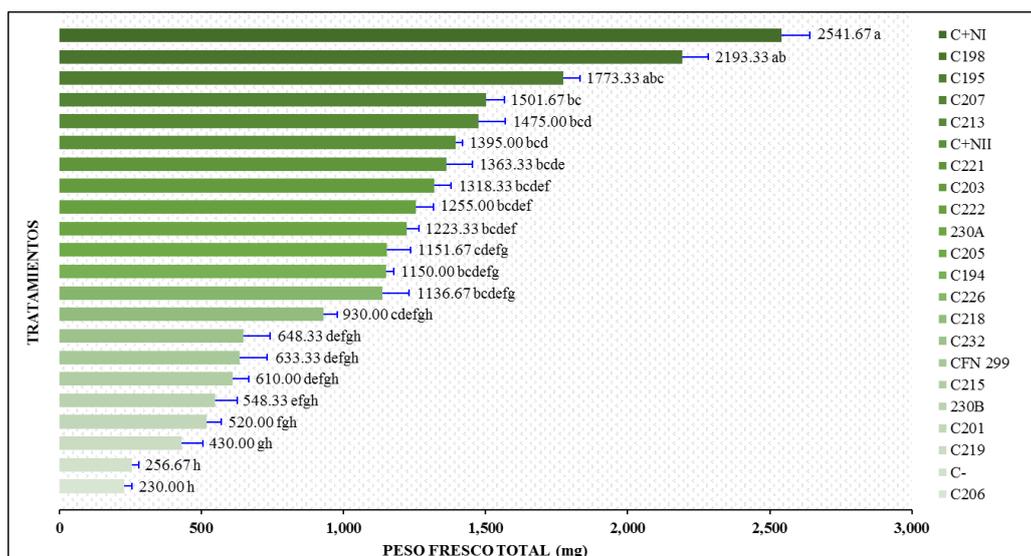


Figura 20: Prueba de Fisher ($P < 0,05$) para los promedios de peso fresco total en *L. leucocephala*

La prueba de Fisher ($P < 0,05$) para peso fresco total en *L. leucocephala* (Figura 20) nos muestra que con el Tratamiento C+NI (Testigo) 2 561,67 mg es el que obtuvo el mayor promedio de peso fresco total siendo estadísticamente igual al tratamiento

C198, C195, los que obtuvieron peso de 2 192,33 y 1 773,33 mg y los tratamientos que obtuvieron menor valor en peso fresco total lo comprende los tratamientos C-256,67 y C206 con 230 mg el cual tiene el valor inferior. El valor obtenido es inferior al de (Reyes *et al.*, 2005) quien obtuvo el mayor resultado (35,743 g/planta) esta enorme diferencia se debe a la doble inoculación de rizobios y micorrizas. Las leguminosas usadas en los Sistemas Silvopastoriles (SSPs) para dichos sistemas pasan de los 18% de proteína y se puede alcanzar ganancias de peso en zonas tropicales hasta de 800 g⁻¹animal⁻¹ día⁻¹ en bovinos, y un incremento de hasta dos litros de leche por vaca/día y en el caso de ovinos con ganancias de peso de 106 g/día (Wencomo *et al.*, 2008, Rodríguez *et al.*, 2000).

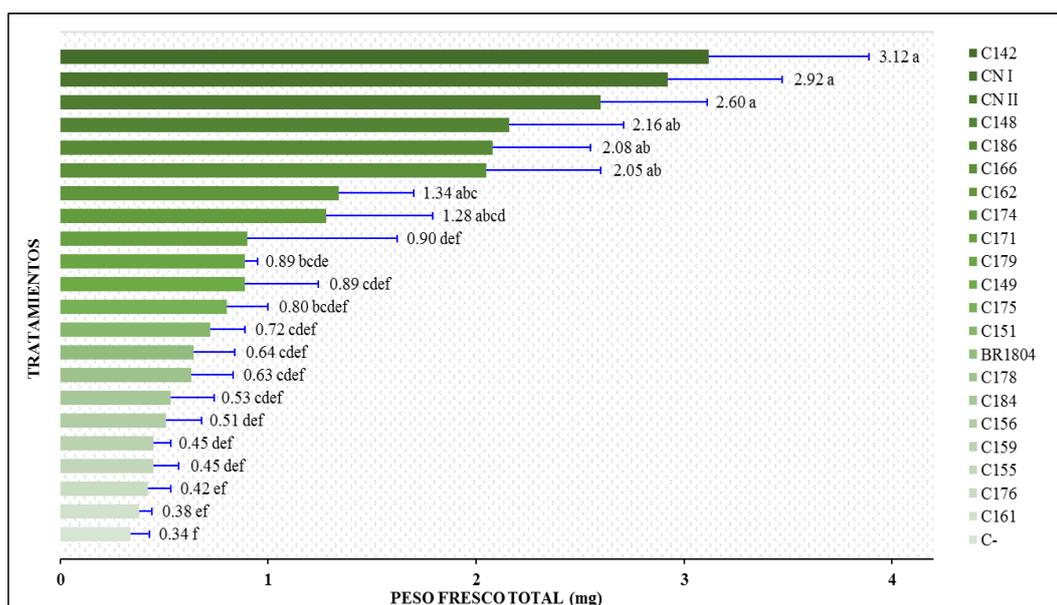


Figura 21: Prueba de Fisher ($P < 0,05$) para los promedios de peso fresco total en *C. macrocarpum*

La prueba de Fisher ($P < 0,05$) para peso fresco total en *C. macrocarpum* (Gráfico 21) nos muestra que con el Tratamiento C142 obtuvo 3,12 mg, el cual es estadísticamente igual a los tratamientos CNI, CNII (Testigos) y los que obtuvieron un 2,92 y 2,60 mg los cuales obtuvieron el mayor promedio de peso fresco total (mg) y los tratamientos que obtuvieron un menor valor en peso fresco total son los C176 y C- (Testigo) los cuales son superados por el testigo BR1804 con un valor de 0,64 mg.

3.4. Peso seco total para *L. leucocephala* y *C. macrocarpum*

Al sistematizar y procesar la información obtenida para peso seco total alcanzado por *L. leucocephala* y *C. macrocarpum*, el análisis de varianza (tabla 6) determinó la existencia de diferencias altamente significativas ($P < 0,05$) para la fuente de variabilidad tratamientos, lo que nos indica que al menos uno resultado ser diferente a los demás, además el efecto que han ejercido los tratamientos estudiados sobre peso seco total estuvo explicado en 74,1% y 85% (R^2) y el coeficiente de variabilidad (C.V.)

con 6,31% y 7,55% nos refiere una alta confiabilidad al encontrarse dentro del rango establecido para este tipo de trabajo de investigación, propuesto por (Calzada,1982).

Tabla 6

ANVA para peso seco total (mg) obtenidos para *L. leucocephala* y *C. macrocarpum* (transformado V_x)

Fuentes de variabilidad	G.L	<i>L. leucocephala</i>			G.L	<i>C. macrocarpum</i>		
		S.C.	P-valor	Sig.		S.C.	P-valor	Sig.
Tratamientos	23	0,67	0,0001	**	21	8,10	0,0001	**
Error exp.	48	0,27			44	1,42		
Total	71	0,94			65	9,52		

C.V. =6,31% $R^2 = 74,1\%$

C.V. = 7,55% $R^2 = 85\%$

**Altamente significativo (P<0,05)

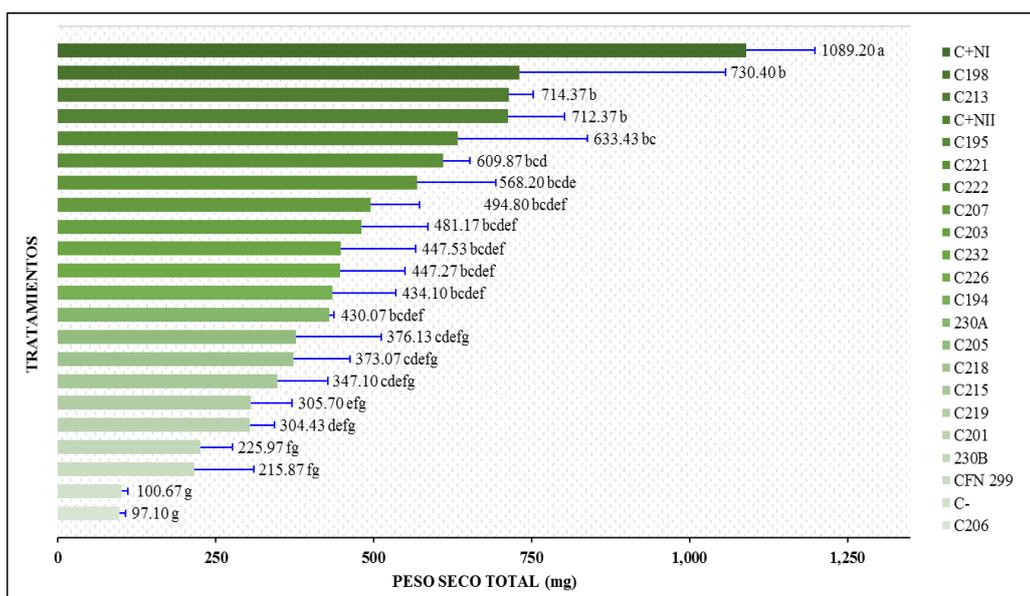


Figura 22: Prueba de Fisher (P<0,05) para los promedios de peso seco total en *L. leucocephala*

La prueba de Fisher (P<0,05) para peso seco total en *L. leucocephala* (Gráfico 22) nos muestra que con el Tratamiento C+NI obtuvo el mayor promedio en peso seco con 1039,20 mg el cual supero estadísticamente a todos los demás tratamientos, los tratamientos C198, C213, C+NII obtuvieron promedios de peso seco total iguales estadísticamente 730,40; 714,37; 712,37 mg y los que presentaron menor promedio fueron los tratamiento C- y C206 con 100,67 y 97,10 mg.

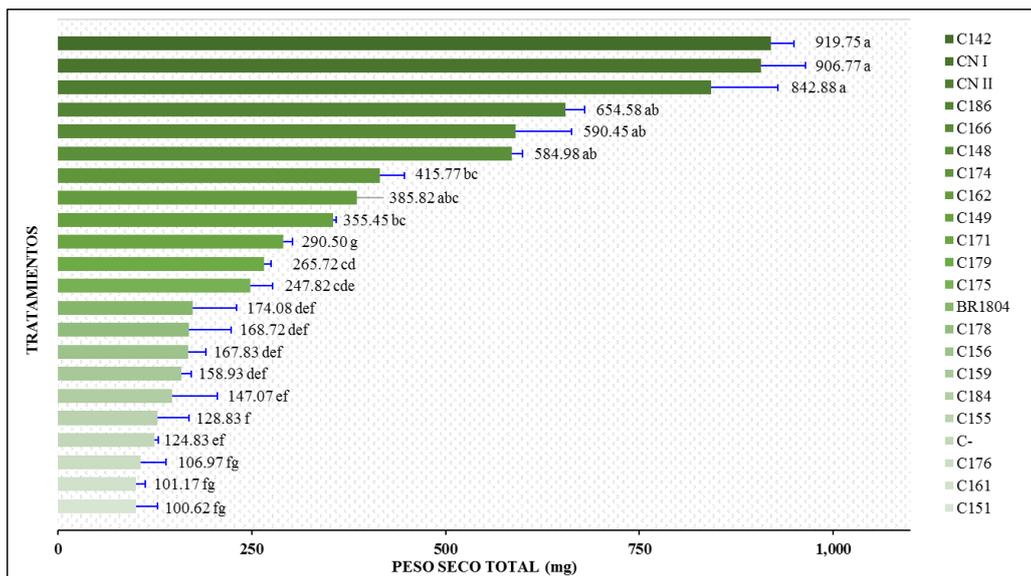


Figura 23: Prueba de Fisher (P<0,05) para los promedios de peso seco total en *C. macrocarpum*

La prueba de Fisher (P<0,05) para peso seco total en *C. macrocarpum* (Gráfico 23) nos muestra los promedios ordenados de menor a mayor, siendo el tratamiento C142 con 919,75 mg el que obtuvo un mayor promedio de peso seco total el cual es igual estadísticamente al tratamiento CNI con 906,77 mg y el que obtuvo un menor valor fue el tratamiento C151 con un valor de 100,62 mg.

3.5. Peso fresco de la raíz (PFR)

El análisis de varianza que presenta la (tabla 7), para peso fresco de la raíz (mg) obtenidos para *L. leucocephala*. y *C. macrocarpum* donde se puede observar que la fuente de variabilidad entre tratamientos arrojó una interpretación estadística altamente significativa (P<0,05) lo que nos indica que al menos uno resultado ser diferente a los demás, además el efecto que han ejercido los tratamientos estudiados sobre peso fresco de la raíz (PFR) total estuvo explicado en 98% y 81% (R²) y el coeficiente de variabilidad (C.V.) con 9,36% y 8,86% nos refiere una alta confiabilidad al encontrarse dentro del rango establecido para este tipo de trabajo de investigación, propuesto por (Calzada,1982).

Tabla 7:

ANVA para peso fresco de la raíz (mg) obtenidos para *L. leucocephala* y *C. macrocarpum* (transformado Vx)

Fuentes de variabilidad	G. L	<i>L. leucocephala</i>			G.L	<i>C. macrocarpum</i>		
		S.C.	P-valor	Sig.		S.C.	P-valor	Sig.
Tratamientos	23	5,98	0,0001	**	21	8,511	0,0001	**
Error exp.	48	0,71			44	1,95		
Total	71	6,69			65	10,46		

C.V. =9,36% R² = 89%

C.V. = 8,86% R² = 81%

**Altamente significativo (P<0,05)

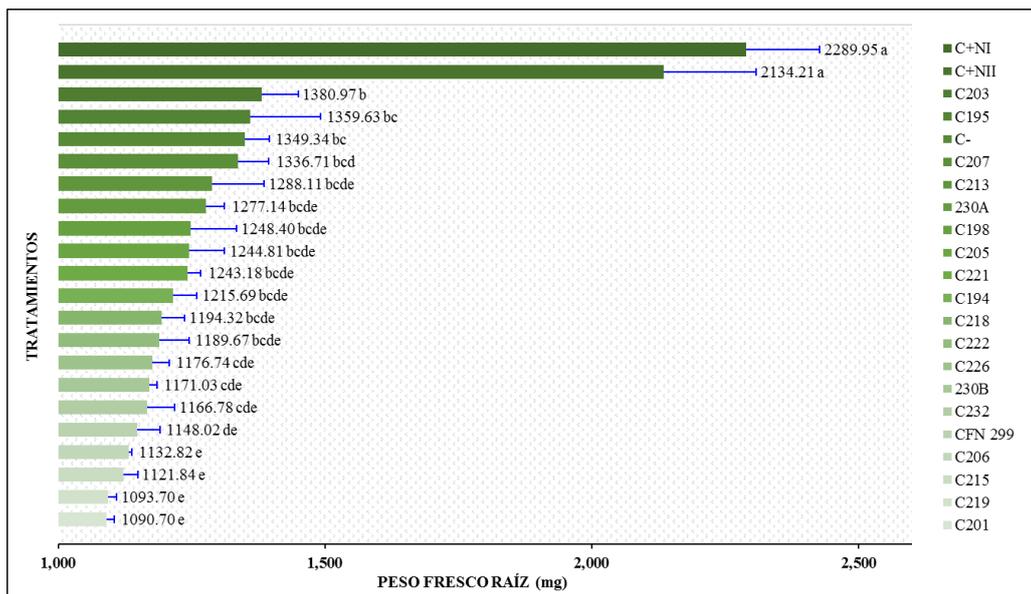


Figura 24: Prueba de Fisher ($P < 0,05$) para los promedios de peso fresco de la raíz (mg) *L. leucocephala*

La prueba de Fisher ($P < 0,05$) para peso seco total en *L. leucocephala* (Figura 24) nos muestra que con el tratamiento testigo C+NI con 2 289,95 mg obtuvo el mayor promedio de peso fresco de la raíz siendo estadísticamente igual al tratamiento C+NII con 2 134,21 mg, y los tratamientos que obtuvieron el rango más bajo son C219 y C201 con 1 093,70 y 1 090,70 mg respectivamente. En un trabajo realizado por Moreno, (2010) con respecto a la inoculación de cepas de *Rhizobium* en arberja y soya se encontraron valores de 230 mg y 420 mg, respectivamente también señala que cuando los inoculantes están almacenados en nevera, los rizobios tienden a disminuir su actividad metabólica. En el caso de las arbóreas Wencomo y Ortiz, (2010) mencionan que la variación del peso del sistema radical cobra especial significado, si se tiene en cuenta que constituye un órgano de reserva para el rebrote.

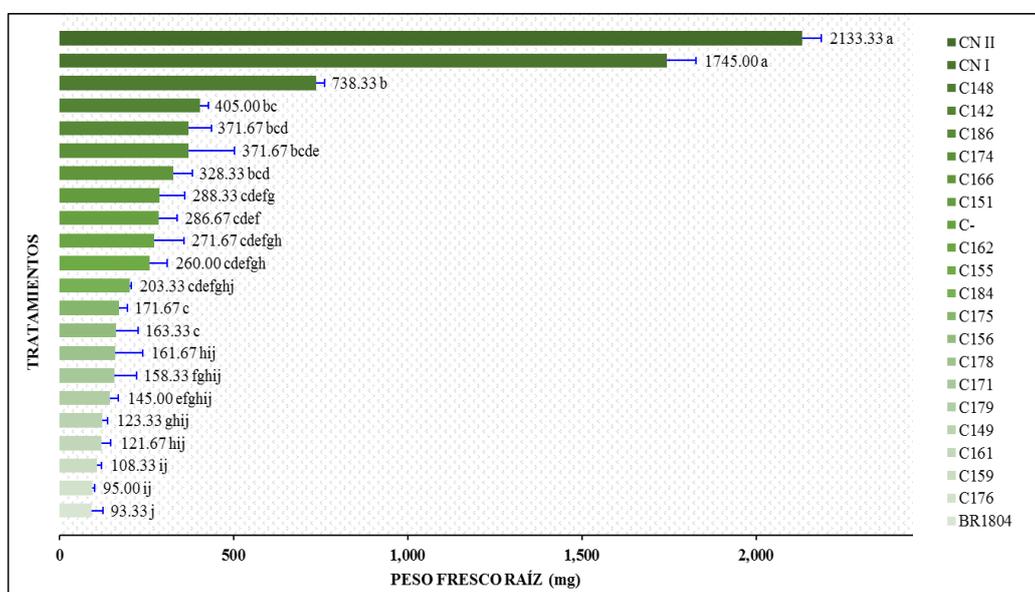


Figura 25: Prueba de Fisher ($P < 0,05$) para los promedios de peso fresco de la raíz en *L. macrocarpum*

La prueba de Fisher ($P < 0,05$) para peso seco total en *C. macrocarpum* (Figura 25) nos muestra los promedios ordenados de menor a mayor, siendo el tratamiento CNII y CNi con 2 133,33 y 1 745,00 mg son iguales estadísticamente y son los que obtuvieron promedios mayores en comparación a los valores más bajos obtenidos por los tratamientos C159, C176, BR1804 con valores de 108,33, 95,00, 93,33 mg.

3.6. Peso fresco de nódulos (PFN)

El análisis de varianza que presenta la (tabla 8), para peso fresco de nódulos (mg) obtenidos para *L. leucocephala*. y *C. macrocarpum* se puede observar que la fuente de variabilidad entre tratamientos arrojó una interpretación estadística altamente significativa ($P < 0,05$) lo que nos indica que al menos uno resultado ser diferente a los demás, además el efecto que han ejercido los tratamientos estudiados sobre peso fresco de nódulos (PFN) total estuvo explicado en 89% y 89% (R^2) y el coeficiente de variabilidad (C.V.) con 24,60% y 25,62% nos refiere una confiabilidad al encontrarse dentro del rango establecido para este tipo de trabajo de investigación.

Tabla 8

ANVA para peso fresco de nódulos (mg) obtenidos para para *L. leucocephala* y *C. macrocarpum* (transformado V_x)

Fuentes de variabilidad	G.	<i>L. leucocephala</i>			G.L	<i>C. macrocarpum</i>		
	L	S.C.	P-valor	Sig.		S.C.	P-valor	Sig.
Tratamientos	23	1651,4	0,0001	**	21	51,57	0,0001	**
Error exp.	48	213,66			44	6,07		
Total	71	1865,1			65	57,64		

C.V. = 24,60% $R^2 = 89\%$

C.V. = 25,62% $R^2 = 89\%$

**Altamente significativo ($P < 0,05$)

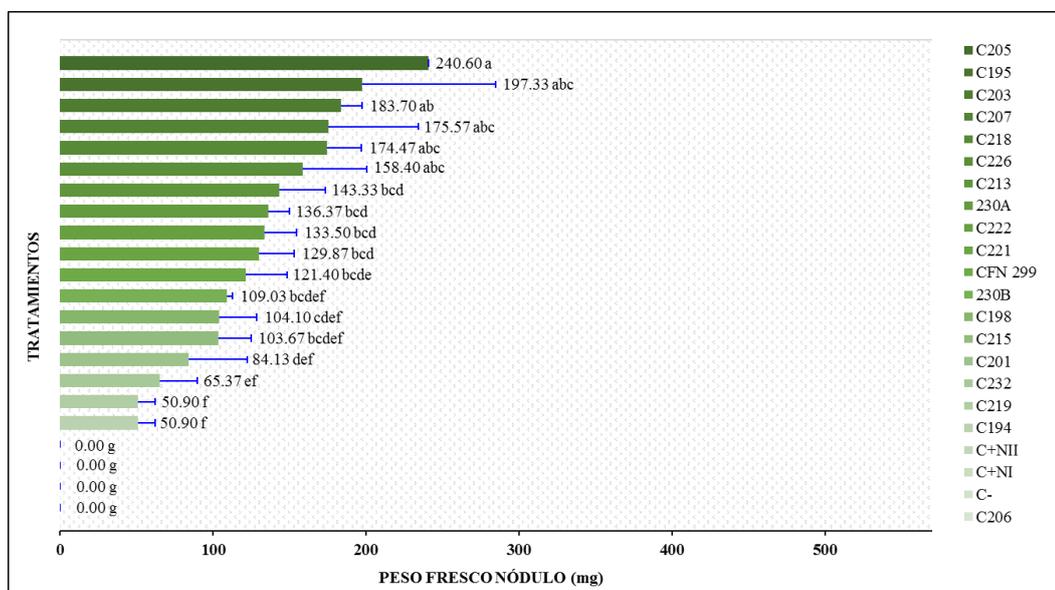


Figura 26: Prueba de Fisher ($P < 0,05$) para los promedios de peso fresco de nódulos (mg) *L. leucocephala*

La prueba de Fisher ($P < 0,05$) para peso seco total en *L. leucocephala* (Figura 26) nos muestra que con el tratamiento C205 con 240,60 mg obtuvo el mayor promedio de peso fresco de nódulos siendo estadísticamente igual al tratamiento C195, C203, C207, C218, y C206 con 197,33; 183,70; 175,57; 147,47; 158,4 mg, si comparamos los resultados obtenidos con Casanova *et al.*, (2009) estos distan en gran cantidad por que el autor obtuvo un peso promedio de nódulos de 570 miligramos y un valor mínimo que el obtiene es de 330 mg, y los tratamientos que obtuvieron el rango más bajo son C219 y C201 con 1093,70; 1090,70 mg respectivamente.

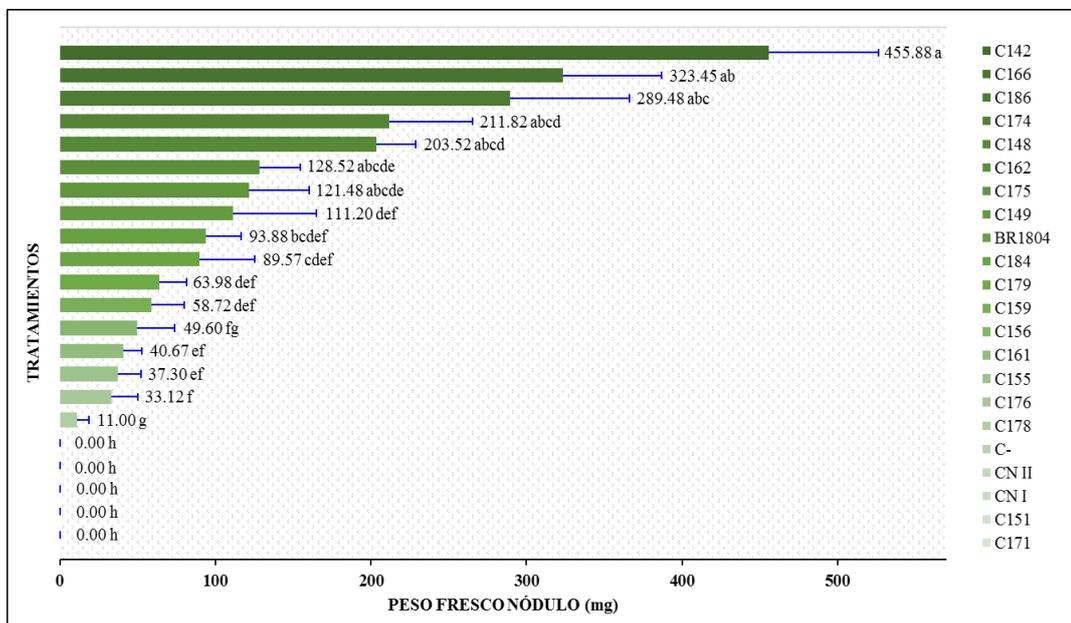


Figura 27: Prueba de Fisher ($P < 0,05$) para los promedios de peso fresco de nódulos en *C. macrocarpum*

La prueba de Fisher ($P < 0,05$) para peso seco total en *C. macrocarpum* (Figura 27) nos muestra los promedios ordenados de menor a mayor, siendo el tratamiento C142 con 455,88 mg es el que obtuvo un mayor resultado, pero son iguales estadísticamente a los tratamientos C166, C186, C174, C148, y C162 en comparación a los valores más bajos obtenidos por los tratamientos C161, C155, C176 y C178 con valores de 40,67; 37,30; 33,12 y 11,00 mg.

3.7. Peso seco de nódulos (PSN)

El análisis de varianza que presenta la (tabla 9), para peso seco de nódulos (mg) obtenidos para *L. leucocephala* y *C. macrocarpum* se puede observar que la fuente de variabilidad entre tratamientos arrojó una interpretación estadística altamente significativa ($P < 0,05$) lo que nos indica que al menos uno resultado ser diferente a los demás, también el efecto que han ejercido los tratamientos estudiados sobre peso seco de nódulos (PSN) total estuvo explicado en 93% y 88% (R^2) y el coeficiente de variabilidad (C.V.) con 16,11% y 28,27% nos refiere una confiabilidad al encontrarse dentro del rango establecido para este tipo de trabajo de investigación.

Tabla 9

ANVA para peso seco de nódulos (mg) obtenidos para para *L. leucocephala* y *C. macrocarpum* (transformado V_x)

Fuentes de variabilidad	G.L	<i>L. leucocephala</i>			<i>C. macrocarpum</i>			
		S.C.	P-valor	Sig.	G.L	S.C.	P-valor	Sig.
Tratamientos	23	387,87	0,0001	**	21	27,08	0,0001	**
Error exp.	48	30,49			44	3,77		
Total	71	418,36			65	30,85		

C.V. = 16,11% $R^2 = 93\%$

C.V. = 28,27% $R^2 = 88\%$

**Altamente significativo ($P < 0,05$)

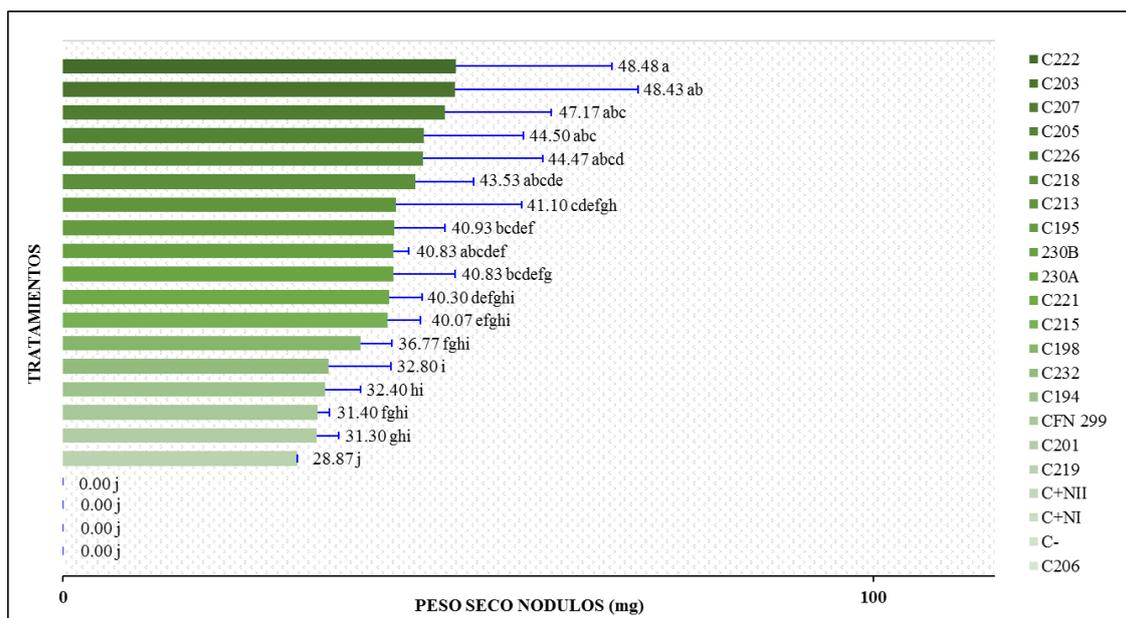


Figura 28: Prueba de Fisher ($P < 0,05$) para los promedios peso seco de nódulos (mg) *L. leucocephala*

La prueba de Fisher ($P < 0,05$) para peso seco de nódulos en *L. leucocephala* (Figura 28) nos muestra que el tratamiento C22 con 48,48 mg obtuvo el mayor promedio de peso seco de nódulos siendo estadísticamente igual al tratamiento C203, C207, C205, C226, y C218 con 48,23; 47,17; 44,50; 44,47; 43,53 mg, los resultados obtenidos no se aproximan a los encontrados por Casanova *et al.*, (2009) quien encontro la formación de nódulos en la raíz del Maní forrajero (*Arachis pintoi*) su mejor tratamiento que ocupa el primer rango estadístico con un promedio de 0,54 gramos de peso seco, y los tratamientos que obtuvieron el rango más bajo es C219 con 29,87 mg respectivamente.

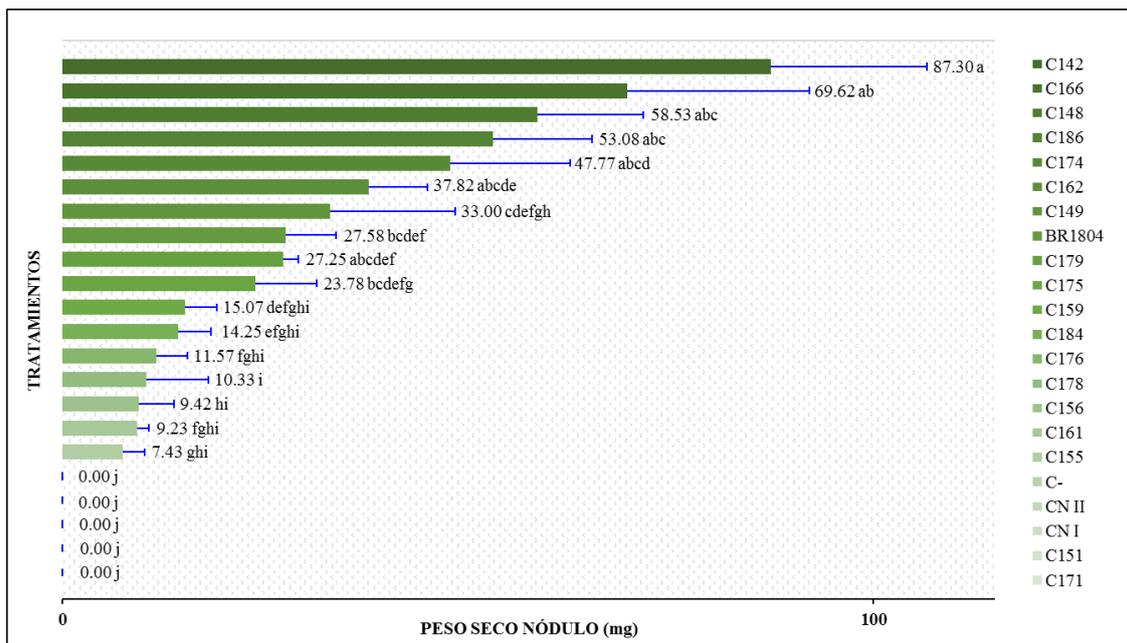


Figura 29: Prueba de Fisher ($P < 0,05$) para los promedios peso seco de nódulos en *C. macrocarpum*

La prueba de Fisher ($P < 0,05$) para peso seco de nódulos en *C. macrocarpum* (Figura 29) nos muestra los promedios ordenados de menor a mayor, siendo el tratamiento C142 con 87,30 mg es el que obtuvo un mayor resultado, pero son iguales estadísticamente a los tratamientos C166, C148, C186, C174, y C162 en comparación a los valores más bajos obtenidos por los tratamientos C161, C155, con valores de 9,23 y 7,43 mg. De acuerdo con lo expresado por Kijne, (1992) citado Bécquer, (2002), una infección exitosa no se inicia en la superficie de la raíz, sino que consiste en un proceso multidisciplinario que comienza en la rizosfera. En este proceso toman parte la activación de los genes de nodulación, la ocupación por la bacteria de los sitios más apropiados de la superficie radicular y la liberación del estímulo por el rizobios, estos factores y sumados otros más están relacionados con el peso seco de nódulos

3.8. Número de nódulos (NN)

El análisis de varianza que presenta la (tabla 10), para numero de nódulos obtenidos para *L. leucocephala*. y *C. macrocarpum* se puede observar que la fuente de variabilidad entre tratamientos arrojó una interpretación estadística altamente significativa ($P < 0,05$) lo que nos indica que al menos uno resultado ser diferente a los demás, también el efecto que han ejercido los tratamientos estudiados el número de nódulos (NN) total estuvo explicado en 90% y 72% (R^2) y el coeficiente de variabilidad (C.V) con 24,48% y 31,38% nos refiere una confiabilidad al encontrarse dentro del rango establecido para este tipo de trabajo de investigación.

Tabla 10

ANVA para número de nódulos por planta obtenidos para *L. leucocephala* y *C. macrocarpum* (transformado Vx)

Fuentes de variabilidad	G.L	<i>L. leucocephala</i>			Sig	<i>C. macrocarpum</i>			
		S.C.	P-valor	Sig		G.L	S.C.	P-valor	Sig.
Tratamientos	23	88178,1	0,0001	**	21	280,7	0,0001	**	
Error exp.	72	10135,7			88	107,8			
Total	95	98313,9			109	388,5			

C.V. = 24,48% $R^2 = 90\%$ C.V. = 31,38% $R^2 = 72\%$

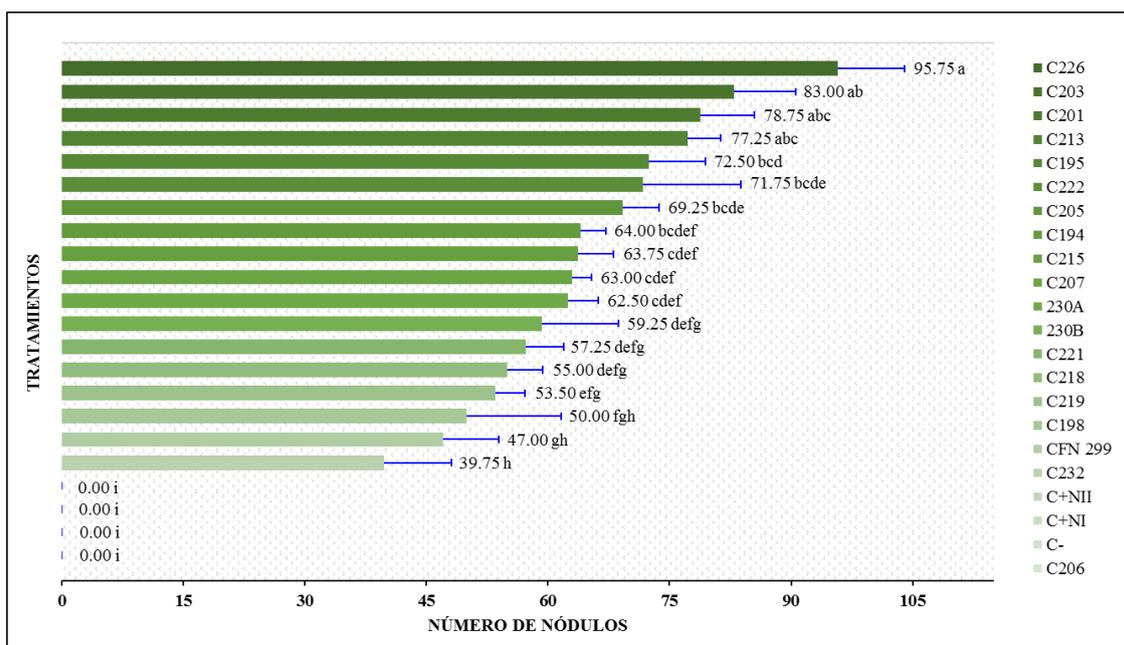


Figura 30: Prueba de Fisher ($P < 0,05$) para los promedios de número de nódulos *L. leucocephala*

La prueba de Fisher ($P < 0,05$) para número de nódulos en *L. leucocephala* (Figura 30) nos muestra que con el Tratamiento C226 obtuvo el mayor promedio en número de nódulos con 95,75 el cual es igual estadísticamente a los tratamientos C203, C201, C113, los resultados obtenidos son superiores a los obtenidos por Casanova *et al.*, (2009) en un estudio de la eficiencia de la fijación biológica de nitrógeno y adaptabilidad del mani forrajero, (*Arachis pintoi*), como cobertura en palma aceitera, (*Elaeis guineensis* jacq.), donde obtuvo el resultado para T4 (Cepa 14) con 81,7 nódulos promedio, T9 (Cepa 23) con 31,0 nódulos, T6 (Cepa 18) en promedio 29,0 nódulos y T11 (Cepa Comercial 6011) con 25 nódulos en promedio, también (Bequer *et al.*, 2013), reportó el aislamiento y evaluación de la eficiencia simbiótica de cepas de rizobios en *Centrosema molle*, *Centrosema plumería* y *C. virginianum* donde encontró un índice alto de nodulación de 18 nódulos. Del mismo modo Cubillos, (2010) encontró una cantidad de nódulos por planta en su tratamiento de mayor respuesta promedio de 16 nódulos por planta respectivamente. Y los que presentaron un

menor promedio de 0 fueron los tratamientos C206, C-, C+NI, C+NII, esto podría estar relacionado con un desbalance del intercambio de nutrientes entre los simbioses

Los resultados superan a los encontrados en por (Rincón *et al.*, 2000) el tratamiento más favorable fue CNT2 con un promedio de $13,66 \pm 4,93$ nódulos/planta junto con el tratamiento C.CUB. con promedio de $18,25 \pm 8,14$ nódulos/ planta, en este ensayo los promedios de nódulos por planta observados cuyos valores medios no superaron los 18,25 en las condiciones del ensayo, fueron bajos en todos los tratamientos.

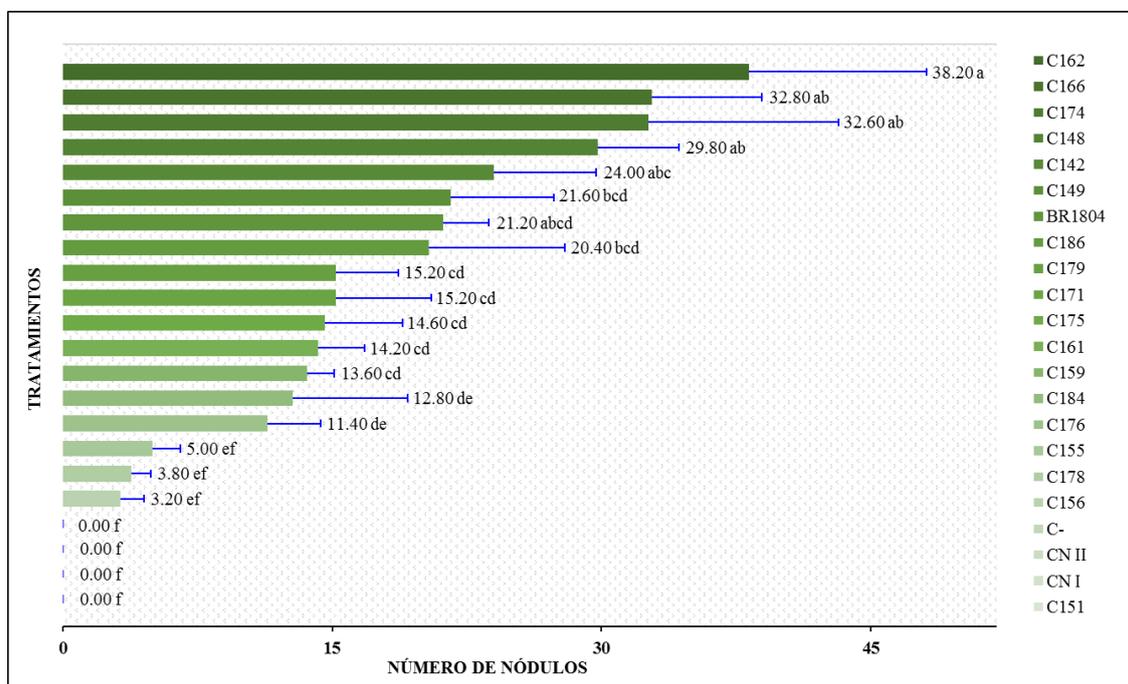


Figura 31: Prueba de Fisher ($P < 0,05$) para los promedios de numero de nódulos de *C. macrocarpum*

La prueba de Fisher ($P < 0,05$) para los promedios de nódulos en *C. macrocarpum* (Figura 31) nos muestra los promedios ordenados de menor a mayor, siendo el tratamiento C162 con 38,20 nódulos es el que obtuvo un mayor resultado, pero es igual estadísticamente a los tratamientos C166, C174, C148, y C162 en comparación a los valores más bajos con valores de 32,8; 32,6; 29,8 y 24,0, los resultados obtenidos distan mucho a los obtenidos por Reyes *et al.*, (2005) donde se realizó la inoculación de bacterias rizobiales, *Entrophospora colombiana* y Donde obtuvo un promedio de 238,25 nódulos/planta. La cantidad de nódulos obtenidas por los tratamientos testigos C-, CNI, CNII es de 0, en un trabajando con *Leucaena leucocephala*, observaron que la aplicación de 40 a 80 kg ha⁻¹ de N redujo en un 50% la fijación biológica de N². Es importante resaltar que el grado de inhibición de la fijación biológica en especies arbóreas también es variable en función de la fuente de N aplicada.

Al observar el número de nódulos para ambas especies inoculadas con los aislamientos y compararlas con las cepas de referencia se pudo ver un mayor número de nódulos en *L. leucocephala* en comparación con los testigos inoculados y también comparado con la especie de *C. macrocarpum* lo que puede deberse a que estos podrían tener una mayor

capacidad de infección probablemente debido a una mejor adaptación a las condiciones evaluadas y al tipo de especie a que estos prefieren.

3.9. Número de nódulos en raíz principal (NNRP)

El análisis de varianza que presenta la (tabla 11), para número de nódulos en la raíz principal obtenidos para *L. leucocephala*. y *C. macrocarpum* donde se puede observar que la fuente de variabilidad entre tratamientos arrojó una interpretación estadística altamente significativa ($P < 0,05$) lo que nos indica que al menos uno es diferente a los demás, además el efecto que han ejercido los tratamientos estudiados sobre la variable evaluada (NNRP) estuvo explicado en 73% y 62% (R^2) y el coeficiente de variabilidad (C.V.) con 17,37% y 61,85% nos refiere una baja confiabilidad *C. macrocarpum* al encontrarse fuera del rango establecido para este tipo de trabajo de investigación.

Tabla 11

ANVA para número de nódulos en raíz principal para *L. leucocephala* y *C. macrocarpum* (transformado Vx)

Fuentes de variabilidad	G.L	<i>L. leucocephala</i>			G.L	<i>C. macrocarpum</i>		
		S.C.	P-valor	Sig		S.C.	P-valor	Sig.
Tratamientos	23	2834.74	0,0001	**	21	150.95	0,0001	**
Error exp.	72	737.25			88	93.04		
Total	95	3571.9			109	243.9		

C.V. = 17.37% $R^2 = 73\%$ C.V. = 61.85% $R^2 = 62\%$

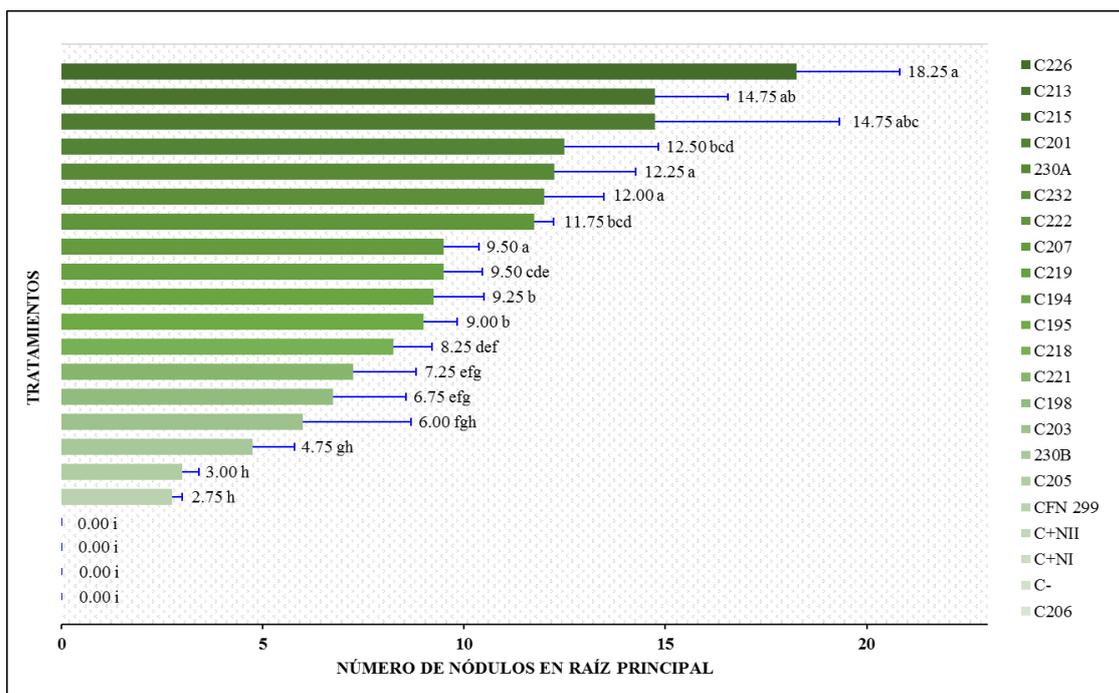


Figura 32: Prueba de Fisher ($P < 0,05$) para promedios para número de nódulos en raíz principal para *L. leucocephala*

La prueba de Fisher ($P < 0,05$) para número de nódulos en raíz principal para *L. leucocephala* (Figura 32), nos muestra que con el Tratamiento C226 con 18,25 es el que obtuvo el mayor promedio de número de nódulos en la raíz principal siendo estadísticamente igual al tratamiento C213, C215 los que obtuvieron una cantidad de 14,75 y 14,75 nódulos, los resultados obtenidos se encuentran cerca lo reportado en el trabajo de investigación de (Bueno y Camargo, 2015) donde señala que el valor promedio más alto (25 ± 8.7) se presentó 18 semanas después del establecimiento, y también señala que los nódulos de mayor tamaño fueron observados principalmente en la raíz principal.

Los tratamientos que obtuvieron un menor valor lo comprenden los tratamientos (testigos) C+NII, C+NI, C-, con un valor de 0, a excepción del tratamiento testigo CFN 209 el cual tiene el valor de 2,75 igual estadísticamente a los tratamientos C203, C230B, C205 los cuales presentaron valores de 6,0; 4,75 y 3,0 nódulos. Rincón *et al.*, (2004) encontraron que *L. leucocephala* nodula con cepas auto aisladas, igualmente se debe destacar la alta especificidad de *L. leucocephala* por rizobios, ya que pocas cepas producen nodulación en esta especie Tang, (1994); Hernández *et al.*, (2012) mencionados por (Bueno y Camargo, 2015).

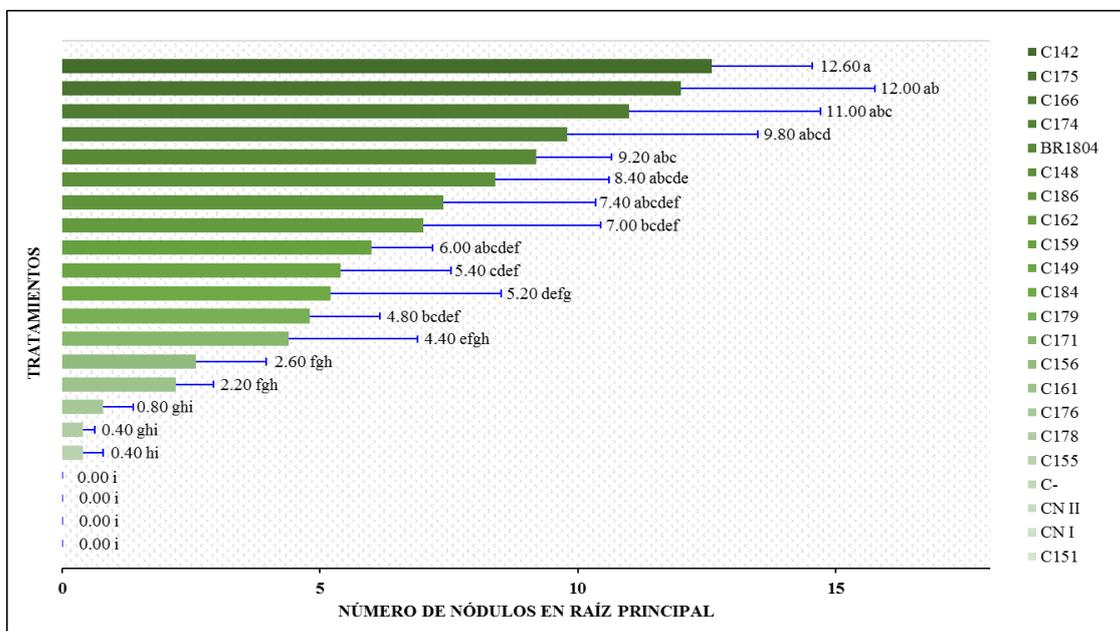


Figura 33: Prueba de Fisher ($P < 0,05$) para los promedios de número de nódulos en raíz principal para *C. macrocarpum*

La prueba de Fisher ($P < 0,05$) para número de nódulos en raíz principal en *C. macrocarpum* (Figura 33) nos muestra los promedios ordenados de menor a mayor, donde el tratamiento C142 con 12,6 nódulos es el que obtuvo un mayor resultado, pero es igual estadísticamente a los tratamientos C175, C166, C174, C148 y C162 con valores de 12, 11, 9,8 y 8,4 y el testigo BR1804 con 9,8 nódulos que alcanzó un valor igual estadísticamente a estos en comparación a los valores más bajos obtenidos por los tratamientos (testigos) C-, CNII, CNI con valores de 0 nódulos. *Rhizobium* sp infecta y forma nódulos en huéspedes

específicos, porque la bacteria contiene un plásmido grande que codifica la información que no se utiliza cuando crece en el suelo como organismo de vida libre, pero por otra parte es vital para infectar a la planta huésped susceptible Rincón *et al.*, (2000). Es por esto que en la simbiosis *Rhizobium*-leguminosa, resulta una interacción muy específica entre la bacteria y la planta mencionados por (Hernández *et al.*, 2012).

3.10. Cantidad de Nitrógeno total (NT) por planta en (mg)

El análisis de varianza que presenta la tabla 12, para cantidad de nitrógeno total (NT) por planta *L. leucocephala* y *C. macrocarpum* donde se puede observar que la fuente de variabilidad entre tratamientos arrojó una interpretación estadística altamente significativa ($P < 0,05$) lo que nos indica que al menos uno es diferente a los demás, además el efecto que han ejercido los tratamientos estudiados sobre la cantidad de nitrógeno total (NT) estuvo explicado en 62% y 87% (R^2) y el coeficiente de variabilidad (C.V.) con 24,5% y 18,25% nos refiere una alta confiabilidad de *C. macrocarpum* al encontrarse en el rango establecido para este tipo de trabajo de investigación, propuesto por (Calzada, 1982).

Tabla 12
ANVA para Cantidad de nitrógeno total para *L. leucocephala*. y *C. macrocarpum* (transformado Vx)

Fuentes de variabilidad	G.L	<i>L. leucocephala</i>			G.L	<i>C. macrocarpum</i>		
		S.C.	P-valor	Sig		S.C.	P-valor	Sig.
Tratamientos	23	69.38	0,0002	**	21	85.24	0,0001	**
Error exp.	48	42.28			44	12.71		
Total	71	111.66			65	97.65		

C.V. = 24.5 % $R^2 = 62\%$ C.V. = 18.25% $R^2 = 87\%$

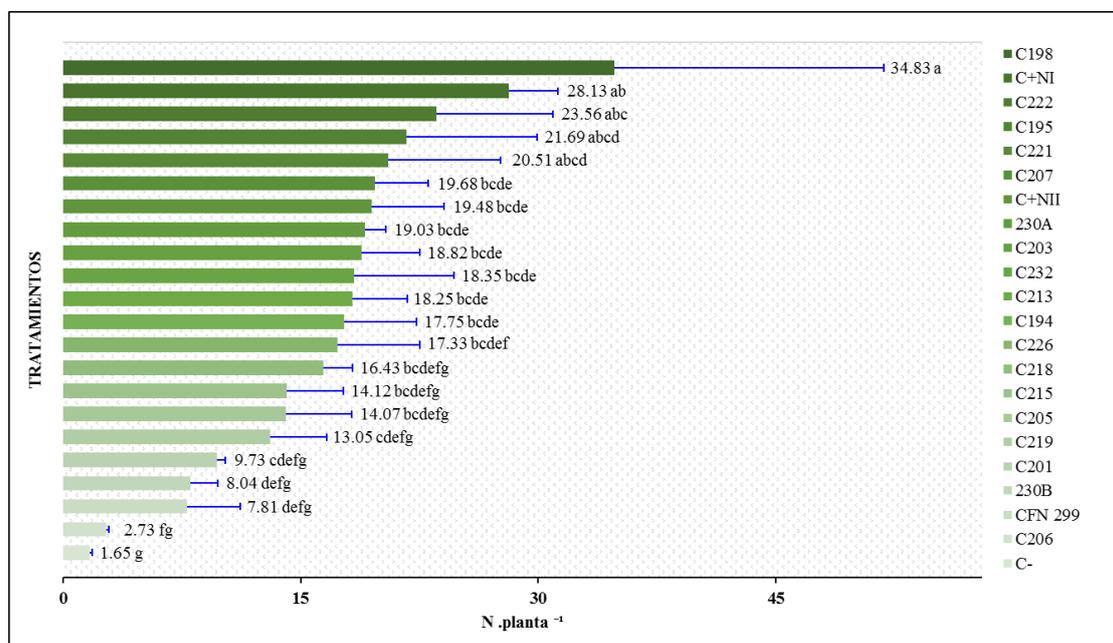


Figura 34 Prueba de Fisher ($P < 0,05$) medida de la cantidad de nitrógeno total en mg para *L. leucocephala*

La prueba de Fisher ($P < 0,05$) para cantidad de nitrógeno para *L. leucocephala* (Figura 36) nos muestra que el tratamiento C198, obtuvo el mayor promedio 34,83 mg de medida de la cantidad de nitrógeno total siendo estadísticamente igual al testigo C+NI el cual alcanza una cantidad de 28,13 mg y este a su vez es igual a los tratamientos C22, C195, C221 los que obtuvieron una cantidad de nitrógeno por planta de 23,56; 21,69; 20,51 mg, estos valores superan a los obtenidos por Rincón *et al.*, (2000) donde encontró que en contenido de NitT fueron C.CUB. y CNT2 con valores promedios de 5,31 y 5,45 mg N/g MST respectivamente, seguidas por las cepas CC1 y CC2 con promedios de 4,55 y 3,54 mg N/g MST y el menor valor presentó el tratamiento C- (testigo), C206, con 1.65, 2.73 mg respectivamente los cuales son superados por Rincón *et al.*, (2000). Por otra parte, Sánchez *et al.*, (1991) mencionados por Bécquer, (2002) consideraron las leghemoglobinas como las nodulinas más abundantes, que funcionan como conductoras de O_2 y facilitan su difusión a los bacteroides; estos son producto de una familia de genes múltiples, cuya expresión es fuertemente activada antes de la fijación del dinitrógeno.

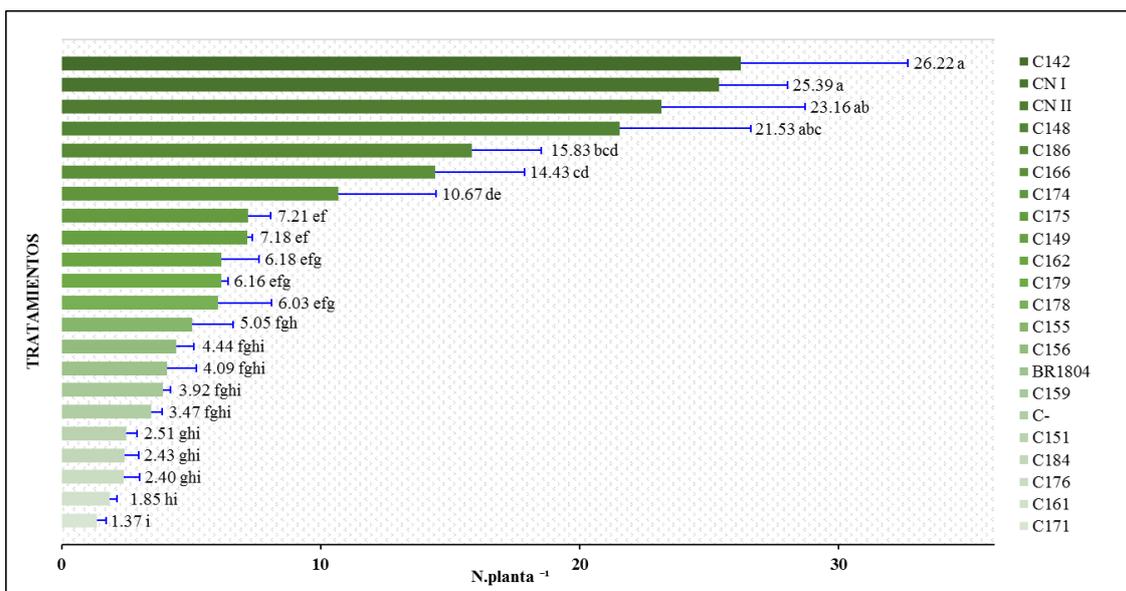


Figura 35: Prueba de Fisher ($P < 0,05$) para la cantidad de nitrógeno total en mg para *C. macrocarpum*

La prueba de Fisher ($P < 0,05$) para la cantidad de nitrógeno total en mg para *C. macrocarpum* (Figura 35) nos muestra los promedios ordenados de menor a mayor, siendo el tratamiento C142, CNI (testigo) con 26,22 y 25,39 mg que obtuvieron un mayor resultado, pero son igual estadísticamente al tratamiento (testigo) CNI, el testigo CNII con 23,16 mg es igual estadísticamente al tratamiento C186 con valor de 21,53 mg en comparación a los valores más bajos obtenidos por los tratamientos C161 y C171 con valores de 1,85 y 1,37 mg.

CONCLUSIONES

- ✓ Se obtuvieron y seleccionaron 36 aislados a partir de nódulos de *L. leucecephala* y *C. macrocarpum*, los cuales presentaron características morfo coloniales muy diversos y además presentaron una variada eficiencia simbiótica, a pesar de haber sido aislados de suelos de pasturas degradadas.
- ✓ Las cepas 198, 222 y 195 aislados de *L. leucecephala* pueden ser considerados como cepas promisorias pues presentaron mayores resultados en las variables, demostrando además que los aislados nativos son más eficientes en la fijación biológica de nitrógeno que las cepas de referencia, factor determinante en la conservación de la biodiversidad ecológica del suelo
- ✓ Las cepas 142, 186 y 148 aislados de *C. macrocarpum* pueden ser considerados como cepas promisorias pues presentaron mayores resultados en las variables; cepas que pueden ser utilizadas para ensayos de validación de eficiencia simbiótica en campo.

RECOMENDACIONES

- ✓ Realizar inoculaciones en campo con cepas de Rizobios aisladas en este trabajo de investigación, para evaluar fijación simbiótica de nitrógeno
- ✓ Realizar una clasificación taxonómica a nivel de especie de las cepas efectivas obtenidas en el presente trabajo y que puedan ser depositadas en el cepario de la Universidad Nacional de San Martín y que puedan ser utilizados en la industria de los inoculantes.
- ✓ Realizar otros trabajos con plantas leguminosas nativas de la zona

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Bécquer, J. (2002). *La simbiosis leguminosa-rizobio: características generales e importancia productiva*. Pastos y Forrajes Vol.25, No.2.
- Becquer, J. (2013). *Eficiencia simbiótica de rizobios nativos de Sancti Spíritus, Cuba, inoculados en Centrosema molle*. Pastos y Forrajes. Matanzas, v.36, n.3, sept.
- Beck, D., Materon, L.& Afandi, F. (1993). *Practical rhizobium-legume technology manual*. ICARDA. Syria. p. 55
- Brewin, N. (2004). *Plant cell wall remodelling in the rhizobium-legume symbiosis*. Critical Reviews in Plant Sciences 23, 293-316.
- Bueno, L. y Camargo, J. (2015). *Nitrógeno edáfico y nodulación de Leucaena leucocephala (Lam.) de Wit en sistemas silvopastoriles*. Acta Agronómica, 64(4), 349-354.
- Bottomley, P. y Myrold, D. (2015). *Biological N inputs. Chapter 15. In Soil microbiology, ecology, and biochemistry, Eldor, P.A.* Fourth edition 365-387.
- Bruce, S/a. *Introducción a la biología celular*. 2^{da} Edición Buenos Aires: Medica Panamericana 2006. Pág.: 11,14 - 20.
- Casanova, B., Bernal, G., Morales, R., y Gusqui, L. (2009). *Estudio de la eficiencia de la fijación biológica de nitrógeno y adaptabilidad del mani forrajero, (Arachis pintoi), como cobertura en palma aceitera, (Elaeis guineensis Jacq.), bajo dos condiciones de siembra en ancupa (cipal). la concordia. XII Congreso Ecuatoriano de la Ciencia del Suelo*. Colombia .
- Cubillos, J. (2010). *Evaluación bajo condiciones de invernadero de Rhizobium sp nativos como fijador de nitrógeno en plantas leguminosas utilizadas como forraje en el centro biotecnológico del caribe*. Panamá.
- De Felipe, M. (2006). *Fijación biológica de Di nitrógeno atmosférico en vida libre*. In *Fijación de Nitrógeno: fundamentos y aplicaciones*. Revista Cubana de Ciencias Agrícola 23, 140-148.
- Dionisio, J. y Pimentel, I. (2016). *Amostragem e preparo do solo*. Capítulo II. En: *Guia práctico de biología do solo*. Curitiba-Brasil. SBCS/NEPAR.
- Dixon, R. & Kahn, D. (2004). *Genetic regulation of biological nitrogen fixation*. Nature Reviews. Microbiology 2, 621-631.
- Dirección de productividad Agraria (DPA). Dirección Regional de San Martín (DRASAM). (2016). *Diagnóstico de la cadena de valor de ganadería vacuno*, 55pp.
- Espinoza, Y. & Malpica, L. (2007). *El género Rhizobium como inoculante para leguminosas*. En CENIAP/INIA. *Revista Digital del Centro Nacional de Investigaciones Agropecuarias*. Maracay, Venezuela.

- Field, S. (2004). *Global nitrogen cycling out of control*. Environmental Health Perspectives 112, 557–563.
- Galloway, J., Dentener, F., Capone D., Boyer, E., Howarth, R., Seitzinger, S. ... Vörösmarty, C.J. (2004). *Nitrogen cycles: past, present, and future*. Biogeochemistry. 70, 153–226.
- Gage, D. (2004). *Infection and invasion of roots by symbiotic, nitrogen-fixing rhizobia during nodulation of temperate legumes*. Microbiol Mol Biol Rev 68, 280-300.
- Graham, P. (2000). *Biological Dinitrogen Fixation: Symbiotic*. In *Principles and applications of soil microbiology*. pp. 405-417. Upper Saddle River, NJ, Estados Unidos: Prentice Hall. Inc.
- Graham, P. y Vance, C. (2003). *Legumes: Importance and Constraints to Greater Use*. Plant Physiology, 131, 872–877.
- Hernández, J., Cubillos, J. y Milian, P. (2012). Aislamiento de cepas de *Rhizobium spp.*, asociados a dos leguminosas forrajeras en el Centro Biotecnológico del Caribe. Revista Colombiana de Microbiología Tropical. Vol. 2 N° 2.
- Herridge, D., Peoples, M. y Boddey, R. (2008). *Global inputs of biological nitrogen fixation in agricultural systems*. Plant Soil 311: 1–18.
- Hungría, M. (1994). Coleta de nódulos e isolamento de rizobio. (Ed.). Manual de métodos empregados em estudos de microbiología agrícola. Brasília, DF: EMBRAPA-SPI; Goiânia: EMBRAPA-CNPAC; Londrina: EMBRAPA-CNPASO.
- Krishnan, H., & Bennett J. (2006). *Rhizobium-legume symbioses: molecular signals elaborated by rhizobia that are important for nodulation*. Springer, Plant-Associated Bacteria, 57–104.
- Laeremans, T. & Vanderleyden, J. (1998). Review: Infection and nodulation signaling in *Rhizobium - Phaseolus vulgaris* symbiosis. World Journal of Microbiology & Biotechnology 14, 787-808.
- Legume Phylogeny Working Group. (2013). *Towards a new classification system for legumes: Progress report from the 6th International Legume Conference*. South African Journal of Botany, 89, 3-9.
- Lozano, Z., Romero, H. & Bravo, C. (2010). *Influencia de los cultivos de cobertura y el pastoreo sobre las propiedades físicas de un suelo de sabana*. Agrociencia, 44(2), 135-146.
- Lloret, L. & Martínez, E. (2005). *Evolución y filogenia de Rhizobium*. Revista Latinoamericana de Microbiología, 47, 43-60.
- Masson, C., Giraud, E., Perret, X., & Batut, J. (2009). *Establishing nitrogen-fixing symbiosis with legumes: how many rhizobium recipes*. Trends in microbiology, 17(10), 458-466.

- Mahecha, L. (2009). *El silvopastoreo: una alternativa de producción que disminuye el impacto ambiental de la ganadería bovina*. Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias (Colombian Journal of animal science and veterinary medicine),15(2), 226-231.
- Moreira, F., Coelho, K., Ribeiro, P. & Guimarães, A. (2016). *Nursery growth and rhizobia symbiosis of scandent Leguminosae species native to the Amazon region*. Acta Amazonica, 46 (4), 367-376.
- Moreno, L. (2010). *Caracterización de las cepas ICA L9 e ICA J96, de bacterias simbióticas fijadoras de nitrógeno y pruebas de estabilidad de inoculantes elaborados para cultivos de arveja y soya*. Tesis de grado de Master en Ciencias Biológicas. Pontificia Universidad Javerina. Bogotá.
- Navarro, G., & Navarro, S. (2013). *Química del suelo y de nutrientes esencial de plantas*. España: Mundi- prensa.
- Nogueira, N., Olivera, O., Martins, C., & Bernardes, C. (2012). Utilización de leguminosas para recuperación de áreas degradadas. Enciclopedia Biosfera, 8(14), 2012-2013.
- Peix, A., Ramírez, E. & Bedmar, E. (2015). *Bacterial associations with legumes*. Critical Reviews in Plant Sciences. 34:17-42.
- Pérez, G., Gómez, G., Nápoles, M. & Morales, B. (2008). *Aislamiento y caracterización de cepas de rizobios aisladas de diferentes leguminosas en la Region de Cascajal, Villa Clara*. Pastos y Forrajes, 31(2).
- Postgate, J (1998). *Nitrogen Fixation*, 3rd Edition. Cambridge University Pres, Cambridge UK.
- Pomarsol, C. (2014). *Producción de plantas patrones, Calidad de plántulas de tres especies forrajeras (Moringa oleifera Lam., Leucaena leucocephala y Cajanus cajan) en condiciones de vivero*, revista la calera vol. 14 N° 22 pág. 21-27.
- Reyes, Ana Maria, Chamorro, Diego Rosendo, Ramirez, Margarita, Efecto de la doble inoculación de rizobios y micorrizas sobre la producción y calidad del forraje de Leucaena leucocephala. Corpoica. Ciencia y Tecnología Agropecuaria [en línea] 2005, 6 (Julio-Diciembre): [Fecha de consulta: 10 de noviembre de 2017] Disponible en:<<http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=449945019006>> ISSN 0122-8706.
- Rincón, J., Clavero, T., Razz, R., Pietrosevoli, S., Mendez, F., & Noriega, N. (2000). *Efecto de la inoculación con cepas nativas e introducidas de Rhizobium sobre la fijación de nitrógeno en leucaena (Leucaena leucocephala (Lam) de Wit)*. Fac. Agron.
- Sánchez, N. (2010). *Selección de cepas nativas de bacterias diazotróficas simbióticas, asociadas a Leucaena leucocephala Wit (Lam.), en el Valle del Cesar y la Guajira*. (Tesis de maestría en biología aplicada). Universidad Militar Nueva Granada, Bogotá.

- Schultze, M. & Kondorosi, A. (1998). *Regulation of Symbiotic root nodule development*. *Annu Rev Genet* 32, 33-57.
- Somasegaran, P. & Hoben, H. (1994). *Handbook for Rhizobia, Methods in legume – Rhizobium Technology*. Springer Verlag. New York. Inc.
- Sosa, A., Elías, A., García, O. & Sarmiento, M. (2004). *Aislamiento y caracterización fenotípica parcial de cepas de rizobios que nodulan leguminosas rastreras*. *Rev. cubana Cienc. agríc.* 38 (2):197
- Soto, L. & Bace, B. (2001). *Mecanismos de Protección de la Nitrogenasa a la Inactivación por Oxígeno*. *Revista Latinoamericana de Microbiología* 43, 37-4
- Sosa, R., Cabrera, J., & Zavaleta, M. (2010). Folleto Técnico No. 4: *Fertilización Biológica: Alternativa para la producción sustentable de forrajes*. Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias. Campo Experimental Chetumal. Centro Regional del Sureste. México 52 p
- Sprent, I.J. (2001). *Nodulation in legumes*. Royal Botanic Garden. Kew. 146 p.
- Sullivan, P. (2007). *El Manejo Sostenible de Suelos*. *Attra*, 1, 1-40. Recuperado a partir de [internal pdf://manejo_sostenibel_de_suelos0356763393/Manejo_sostenibel_de_suelos.pdf](http://internal.pdf://manejo_sostenibel_de_suelos0356763393/Manejo_sostenibel_de_suelos.pdf).
- Tang, M. Tamayo, E. & Márquez, B. (1982). *Estudio de la acción de siete cepas de rhizobium sobre cuatro leguminosas*. *Pastos y Forrajes* Vol. 5, No. 2. Cuba.
- Tang, M., Menéndez, J., Gazó, M., Castañeda, A. & Pérez, E. (1992). *Respuesta de leguminosas tropicales a la inoculación con rizobio. Centrosema pubescens y Teramnus labialis*. *Pastos y Forrajes*, Vol. 15, No. 3. Cuba.
- Tang, M. (1994). *Efecto de la inoculación con Rhizobium en el rendimiento de materia seca, contenido de nitrógeno y nodulación en Leucaena leucocephala CV. CNIA-250*. Estación Experimental de Pastos y Forrajes "Indio Hatuey" Matanzas, Cuba. Vol. 17, Núm. 2.
- Tripathi, S. (2009). *Human influences on mobility of nitrogen in the environment: Needs for research and management*. *Acta Ecologica Sinica*, 29(2), 130-135.
- Valdez, R., Soriano, B., Prado, G., Zavaleta, D., Matsubara, M., Zúñiga, D & Correa, D. (2016). *Symbiotic and Agronomic Characterization of Bradyrhizobial Strains Nodulating Cowpea in Northern Peru*. In *Biological Nitrogen Fixation and Beneficial Plant-Microbe Interaction* (pp. 195-212). Springer International Publishing.
- Vance, C., Graham, P. & Allan, L. (2000). *Biological nitrogen fixation: phosphorus-a critical need*. In: *Nitrogen fixation: from molecules to crop productivity. Proceedings of the 12th International Congress on Nitrogen Fixation*. Foz do Iguaçu, Paraná, Brazil. p. 509

- Vincent, J. (1970). *A manual for the practical study of root nodules bacteria*. Backwell Sci. Publications, Oxford.
- Wencomo, H., Ortiz, R. & Machado, R. (2008). *Evaluación morfoagronómica e isoenzimática y selección de accesiones de Leucaena spp. con fines silvopastoriles*. Tesis. Dr. C. Agrícola. Estación experimental de pastos y forrajes. Indio Hatuey, Cuba. 106 pp.
- Wencomo, H. B., & Ortiz, R. (2010). *Comportamiento de 23 accesiones de Leucaena spp. en condiciones de viver*.

ANEXOS

Protocolos a ser utilizados en los análisis microbiológicos del proyecto

1. Enumeración de bacterias totales aerobios mesófilos:

2. Se pesarán 10 g de suelo tamizado y se añadirán en frascos tapa rosca azul de 250 ml conteniendo 90 ml de Solución Salina Fisiológica estéril (SSFe) al 0.85% (dilución 1:10).
3. Los frascos serán homogenizados en agitador mecánico a 200 rpm por un espacio de 15 minutos.
4. Con una micropipeta, transferir 1 ml de suspensión a un tubo de ensayo conteniendo 9 ml de SSFe, y dispersar en el agitador de tubos por 30 segundos (dilución 1:100)
5. Con otra pipeta, transferir 1 ml del tubo anterior a otro tubo conteniendo 9 ml de SSFe y agitar en Vortex (1:1000).
6. Repetir el ítem anterior, hasta obtener diluciones de hasta 1:10000 a 1:100000).
7. Una vez realizadas las diluciones correspondientes, transferir 0.1 ml de las tres últimas diluciones en la superficie de las placas de Petri, conteniendo el medio de cultivo Agar nutritivo (Anexo 1)
8. Es posible usar la técnica de gota en placa (Miles and Misra), empleando solamente 30 μ L de las diluciones. Esta técnica permite usar menos material y menos tiempo (Ver anexo).
9. Esparcir el inóculo (0.1 ml) en la superficie del medio con ayuda del asa de Digrafsky, esterilizada en alcohol de 96 ° GL y flameado en el mechero Bunsen. Repetir el proceso en cada placa de Petri.
10. Las placas de Petri se rotularán mediante la siguiente codificación: Suelo, zona, tratamiento, medio de cultivo, fecha y responsable, sellar con Parafilm, e incubar a 25°C e invertidas por aproximadamente 7 días.
11. Seleccionar las placas de Petri con las diluciones que contengan entre 20 a 200 colonias aisladas (UFC).
12. El cálculo se realizará mediante la siguiente fórmula:

$$\text{UFC g}^{-1} = (\text{Promedio de conteos x dilución seleccionada x 10}) \times \text{g}^{-1}.$$

13. Para expresar los datos correctamente, la cantidad de suelo se deberá expresar en gramos de suelo seco a 105 °C hasta peso constante.

2. Determinación de bacterias esporulados:

1. Los pasos 1 y 2 serán los mismos que para la determinación de bacterias totales.
2. Tomar una alícuota de 5 ml de la dilución (1:10) y colocarlo en baño maría a 80°C, por 15 minutos. Esto eliminará las células vegetativas de la suspensión de suelo.
3. Inmediatamente los tubos serán colocados en agua helada y se colocarán en refrigeración hasta el momento de su siembra.
4. Tomar 1 ml de la suspensión trabajada, y transferir 1 ml de suspensión para un tubo de ensayo conteniendo 9 ml de SSFe y agitar en Vortex para tubos por un espacio de 20 segundos (dilución 1:100).
5. Transferir con otra punta esterilizada, 1 ml de la suspensión anterior para otro tubo de ensayo conteniendo 9 ml de SSFe y agitar en Vortex para tubos por un espacio de 20 segundos (dilución 1:1000).
6. Repetir el paso 5 hasta obtener la dilución 1:10000.
7. Con una punta nueva, transferir 0,1 ml de las tres últimas diluciones a la superficie de placas de Petri, conteniendo medio de cultivo Agar nutritivo (Anexo 1). Por cada dilución se utilizarán 3 repeticiones.
8. Se esparcirá el inóculo con ayuda de un asa de Digralsky esterilizada por inmersión en alcohol etílico (96° GL) y flameada en mechero Bunsen. Repetir el proceso en cada placa de Petri.
9. Las placas de Petri serán debidamente rotuladas mediante la siguiente codificación: Suelo, zona, tratamiento, medio de cultivo, fecha y responsable, sellar con Parafilm e incubadas de manera invertida a 30°C, durante 7 días.
10. Seleccionar las placas de Petri con las diluciones que contengan entre 20 y 200 UFC aisladas.
11. Para los cálculos seguir los pasos 10 y 11 de la determinación de bacterias totales.

3. Determinación de hongos totales:

1. Los pasos 1, 2, 3 y 4 serán los mismos que para la determinación de bacterias totales.
2. Transferir con otra punta esterilizada, 1 ml de la suspensión anterior para otro tubo de ensayo conteniendo 9 ml de SSFe y agitar en Vortex para tubos por un espacio de 20 segundos (dilución 1:100).
3. Repetir el procedimiento 2, hasta la dilución 1:10000.
4. Transferir 0.1 ml de las tres últimas diluciones a placas de Petri conteniendo Medio de Martín (Anexo 2), específico para hongos.
5. Esparcir el inóculo con ayuda de un asa de Digrafsky, esterilizada por inmersión en alcohol etílico de 96°C y flameado en mechero Bunsen. Se deberá repetir el proceso después del uso de cada placa de Petri.
6. Las placas de Petri, se rotularán mediante la siguiente codificación: Suelo, zona, tratamiento, medio de cultivo, fecha y responsable, sellar con Parafilm y se incuba a temperatura ambiente por aproximadamente 1 semana.
7. Se seleccionarán las placas de Petri con las diluciones que contengan entre 20 y 200 UFC aisladas.
8. Para los cálculos seguir los pasos 10 y 11 de la determinación de bacterias totales.

4. Determinación de actinobacterias:

1. Los pasos 1 y 2 serán los mismos que para la determinación de bacterias totales.
2. Calentar en baño maría a 50°C por 15 minutos, dispersar las UFC mediante agitación mecánica durante 15 minutos y esperar su sedimentación.
3. Con una micropipeta, transferir 1 ml de suspensión a un tubo de ensayo conteniendo 9 ml de SSFe, y dispersar en el agitador de tubos por 20 segundos (dilución 1:100)
4. Con otra pipeta, transferir 1 ml del tubo anterior a otro tubo conteniendo 9 ml de SSFe y agitar en Vortex (1:1000).
5. Repetir la operación por dos veces hasta obtener diluciones 1:10000 y 1:100000.

6. Pipetear 0.1 ml de las tres ultima diluciones (1:1000; 1:10000 y 1:100000) en placas de Petri conteniendo el medio de cultivo Agar-caseinato Dextrosa (Anexo 3).
7. Esparcir el inóculo con ayuda de un asa de Digrafsky, esterilizada por inmersión en alcohol etílico de 96°C y flameado en mechero Bunsen. Se deberá repetir el proceso después del uso de cada placa de Petri.
8. Las placas de Petri, se rotularán mediante la siguiente codificación: Suelo, zona, tratamiento, medio de cultivo, fecha y responsable, sellar con Parafilm y se incuba a temperatura ambiente por aproximadamente 1 semana.
9. Se seleccionarán las placas de Petri con las diluciones que contengan entre 20 y 200 UFC aisladas.
10. Para los cálculos seguir los pasos 10 y 11 de la determinación de bacterias totales.

5. Enumeración de microorganismos solubilizadores de fosfato:

1. Los pasos 1 y 2 serán los mismos que para la determinación de bacterias totales.
2. Con una micropipeta, transferir 1 ml de suspensión a un tubo de ensayo conteniendo 9 ml de SSFe, y dispersar en el agitador de tubos por 20 segundos (dilución 1:100).
3. Con otra pipeta, transferir 1 ml del tubo anterior a otro tubo conteniendo 9 ml de SSFe y agitar en Vortex (1:1000).
4. Repetir el ítem anterior, hasta obtener diluciones de hasta 1:10000.
5. Pipetear 0.1 ml de las 3 últimas diluciones en medio Sylvester-Bradley, Para cada dilución se usarán tres repeticiones
6. Se esparce el inóculo en la superficie del medio de cultivo con la ayuda del asa de Digrafsky, previamente esterilizada en alcohol etílico de 96°GL, y flameada en mechero Bunsen.
7. Las placas de Petri, se rotularán mediante la siguiente codificación: Suelo, zona, tratamiento, medio de cultivo, fecha y responsable, sellar con Parafilm y se incuba a temperatura ambiente por aproximadamente 1 semana.

8. Se seleccionarán las placas de Petri con las diluciones que contengan entre 20 y 200 UFC aisladas.

6. Respiración basal de suelo en sistema estático:

1. Pesar 10 g de suelo húmedo para determinar la masa de suelo secado a estufa a 105 °C hasta peso constante.
2. Determinar la capacidad de retención de agua (CRA) y corregir la humedad al 60% de la CRA con agua destilada (Anexo 6).
3. Se pesarán 100 g de suelo húmedo previamente tamizado en tamiz con abertura de 2 mm por triplicado, y se transferirá a un frasco de vidrio con tapa hermética de 250 ml.
4. Colocar dentro del frasco de vidrio un tubo de ensayo conteniendo 15 ml de NaOH 0.5 N, para capturar el CO₂ producido y otro tubo de ensayo conteniendo 10 ml agua destilada para mantener la humedad del ambiente.
5. Por cada 10 frascos de vidrio a ser incubados, se deberá realizar una prueba en blanco, que corresponde a un frasco conteniendo apenas un tubo de ensayo con 15 ml de NaOH 0.5 N y otro conteniendo 10 ml de agua destilada.
6. Cerrar herméticamente los frascos de vidrio e incubarlos a 25°C por una semana (168 horas).
7. Después del periodo de incubación, retirar de los frascos de vidrio, los frascos de polietileno conteniendo el NaOH y transferir la solución a un Matraz Erlenmeyer de 125 ml, adicionar 1 ml de una solución de cloruro de bario al 50% y dos gotas de fenolftaleína.
8. Titular el exceso de NaOH con HCl 0.5N.
9. Para calcular la respiración basal del suelo (RBS) de acuerdo a Stotzky (1965).

$$\text{RBS} = \text{C-CO}_2 \text{ mg kg}^{-1} \text{ h}^{-1} = [((\text{b-a}) \times \text{N} \times \text{E} \times 1000\text{x}) / \text{g}] / \text{h}.$$

Donde:

b: Volumen de HCl gastado en la prueba en blanco.

a: Volumen de HCl de gasto en la muestra.

E: Equivalente del carbono

N: Normalidad del HCl.

g: Masa de suelo seco

h: Horas de incubación.

7. Biomasa microbiana y cociente metabólico por el método de la Respiración inducida por el sustrato (RIS):

El método propuesto está basado en el aumento inicial de la tasa de respiración de la población microbiana, hasta el máximo, cuando una fuente de carbono, rápidamente descomponible, es adicionada en exceso al suelo.

1. Pesar 10 g de suelo húmedo, por duplicado para determinar la masa de suelo secado a estufa a peso constante.
2. Determinar la capacidad de retención de agua (CRA) y corregir la humedad al 60% de la CRA con agua destilada (Anexo xxx).
3. Pesar 20 g de suelo seco y transferirlos al frasco de vidrio (250 ml), con un mínimo de tres repeticiones.
4. Adicionar 60 mg de glucosa anhidra, diluida en el agua destilada de acuerdo a lo calculado en la CR-60%.
5. Homogenizar el suelo y la glucosa con una varilla de vidrio, sellar herméticamente y pre-incubar en estufa a 22 °C por 2 horas.
6. Colocar en el frasco de vidrio un tubo de ensayo conteniendo 10 ml de NaOH 0.1 N, e incubar en estufa a 22°C por 4 horas.
7. Realizar una prueba en blanco, utilizando un frasco de vidrio de 250 ml, conteniendo solamente un tubo de ensayo y 10 ml de NaOH 0.1 N.
8. Transferir el NaOH 0.1 N del tubo de ensayo para un Erlenmeyer de 125 ml.
9. Adicionar 0.5 ml de BaCl₂ al 50% y dos gotas de fenolftaleína 0,1%.
10. Titular con HCl 0.025 N y anotar la cantidad de ácido consumida.
11. Para el cálculo de la biomasa microbiana del suelo, se utilizará la siguiente fórmula.

$$\text{BMS } (\mu\text{g C g}^{-1}) = 30 (\text{b-a}) \times [(\text{K} \times 22 \times 1000) / (1,8295 \times \text{PA} \times 4)]$$

Donde:

BMS: Carbono de la biomasa microbiana del suelo ($\mu\text{g C g}^{-1}$).

30: Constante ($\text{mg C mic h ml CO}_2^{-1}$).

b: Media del volumen (ml) de HCl del gasto para titular las pruebas en blanco.

a: ml de HCl gastados para titular las muestras.

K: Concentración de la solución de HCl.

22: Factor de conversión (1 ml de HCl 1.0 M corresponde a 22 mg de CO₂).

1000 = Factor de conversión de Kg de suelo para g de suelo.

1.8295 = Densidad del CO₂ a 22°C.

PA: masa de la muestra (g de suelos seco).

4: Factor de conversión para transformación de 4 horas para 1 hora.

12. Para determinar el cociente metabólico se empleará la siguiente fórmula:

$$q\text{CO}_2 = \text{RBS/C-BMS}$$

